

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

**Resistencia antimicrobiana en aislados de
Escherichia coli de conejos tratados por vía oral con
diferentes pautas de doxiciclina**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alberto Enrique Medina Landaeta

Directores

**José Antonio Ruiz Santa Quiteria
Ricardo de la Fuente López**

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-695-1200-5

© Alberto Enrique Medina Landaeta, 2011

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Veterinaria

Departamento de Sanidad Animal



Tesis Doctoral

**Resistencia antimicrobiana en aislados de *Escherichia coli*
de conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de
doxiciclina**

Alberto Enrique Medina Landaeta

Madrid, mayo de 2011

Memoria presentada por **D. Alberto Enrique Medina Landaeta** para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid

Directores

Dr. José Antonio Ruiz Santa Quiteria. Profesor Titular. Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Dr. Ricardo de la Fuente López. Profesor Catedrático. Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Director del grupo de investigación Infectología Bacteriana Veterinaria "INBAVET".



Resistencia antimicrobiana en aislados de *Escherichia coli* de conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de doxiciclina

Este trabajo ha sido posible gracias a las financiaciones de:

- Ministerio de Educación y Ciencia: Proyecto Nº AGL2004-08139. "*Evaluación del riesgo de generación de resistencias a antimicrobianos en bacterias intestinales de animales tratados, per os, con diferentes pautas terapéuticas*". Período de ejecución 2004-2008.
- Comunidad de Madrid - Universidad Complutense de Madrid: Proyecto Nº CCG07-UCM/AGR-2568: Ayuda para la financiación del grupo de investigación Infectología Bacteriana Veterinaria (INBAVET). Período de ejecución 2007/ 2008.
- Banco Santander Central Hispano - Universidad Complutense de Madrid. Proyecto Nº GR58708: Ayuda para la financiación del grupo de investigación: Infectología Bacteriana Veterinaria (INBAVET), dentro del marco *Programa de creación y consolidación de Grupos de Investigación Banco Santander Central Hispano - Universidad Complutense*. Período de ejecución 2009/2010.



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Veterinaria
Departamento de Sanidad Animal

José Antonio Ruiz Santa Quiteria y Ricardo de la Fuente López, Profesores Titular y Catedrático del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN

Que el trabajo de Tesis titulado: "**Resistencia antimicrobiana en aislados de *Escherichia coli* de conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de doxiciclina**" que presenta el Licenciado en Veterinaria D. Alberto Enrique Medina Landaeta ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y cumple las condiciones exigidas para optar al Título de Doctor por la Universidad Complutense.

Y para que así conste, a todos los efectos, firmamos la presente en Madrid, a 25 de mayo de 2011.

Fdo.: José Antonio Ruiz Santa Quiteria

Fdo.: Ricardo de la Fuente López

A mis padres, a mis hermanos,

A Julio, a Gabriela y a Elenita

“Si te caes siete veces, levántate ocho”

Proverbio chino

AGRADECIMIENTOS

Hace más de cuatro años decidí emprender un camino que me permitiera crecer como persona y profesional, aunque para ello tuviera que dejar atrás a mi País y a mis seres queridos. Durante este tiempo han sido muchos los momentos de tristeza por la partida a un mundo mejor de seres maravillosos que estuvieron en mi vida y que no tuve la oportunidad de despedir. Varios momentos de angustia también me acompañaron en este transitar, pero definitivamente han sido más los momentos de alegrías junto a experiencias valiosas que han significado mucho para mí. De esta larga travesía no solo logro hoy un título de Doctor, sino que he conseguido ser una persona más madura en todos los sentidos y, con la certeza de que el querer hacer las cosas con cariño, ánimo, entereza y optimismo permite alcanzar las metas por más lejanas que parezcan. Sin duda alguna puedo afirmar que en la finalización de todas las etapas de mi vida han existido personas increíbles que me han motivado a seguir adelante, y que de una manera u otra han contribuido a que las cosas hayan sido más fáciles. Por eso quiero agradecer en esta oportunidad y en primer lugar a Dios por darme la fortaleza y la salud para vivir esta aventura.

Al Dr. José Antonio Ruiz Santa Quiteria, por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo, por confiar en mí, por su asesoría, dedicación, amistad y preocupación cuando pasé por malos momentos.

Al Dr. Ricardo De la Fuente López, Director del Grupo de Investigación en Infectología Bacteriana Veterinaria (INBAVET) del Departamento de Sanidad Animal, por darme cabida dentro de este grupo con tan alto nivel científico y académico, por su amistad, su valiosa dirección y apoyo para la consecución de los objetivos.

Al Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, por permitirme realizar mis estudios de tercer ciclo en tan prestigiosa institución.

Al Dr. Ignacio Badiola y a Ana Pérez De Rozas del Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA) Barcelona, responsables del muestreo y del aislamiento de las cepas, permitiéndome seguir adelante con esta investigación.

A Aurora Echeita y Silvia Herrera del Laboratorio de Enterobacterias del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, por su asesoría y ayuda en la estandarización de la técnica de PCR para la detección de CTX-M-9.

A Carmen Torres, Miguel Ángel Moreno, Karmele Colom, Aurora Echeita, Frank M. Aarestrup, Luis Martínez y Jordi Vila quienes generosamente nos proporcionaron las cepas control para las PCR.

A mis extraordinarios e inigualables compañeros de laboratorio y de equipo: José Antonio Orden Gutiérrez, Gustavo Domínguez Bernal, Susana Martínez, Sonia Jurado, Almira Bartolomé, Pilar Horcajo, Aldara Herrero, Chris Pinto y Francisco Javier Carrión, por la receptividad, el apoyo, la ayuda y los consejos, pero sobre todo por ofrecerme una incalculable amistad, gracias a ellos todo fue más fácil, llevadero y divertido.

No puedo dejar de agradecer a Eva Mirasierra y a Belén Rodríguez por los buenos momentos compartidos y por ofrecerme siempre una sonrisa.

Muchas gracias a mi excelente amigo Mauricio Marchant por su ayuda desinteresada no solo en el desarrollo del estudio de integrones sino por todas las veces que lo necesité, te lo agradeceré eternamente Sultán.

Dos personas importantes que me han dado lo mejor de sí mismos, que me han educado con amor, con principios y quienes han sido partícipes de todos mis esfuerzos y logros son mi padre Ulises y mi madre Enalina, ellos son junto a mis hermanos, lo mejor que Dios y la vida me han regalado, gracias por apoyarme siempre.

Quiero agradecer efusivamente a Julio Paz y a mi amada hermana María Elena, pilares fundamentales que me sostuvieron y ayudaron a llegar al final de este camino, gracias por darme tanto y por estar siempre a mí lado, no tengo palabras para agradecer todo el cariño y la paciencia que me han regalado.

A la madrileña de pura cepa María Elena Arriero (Elenita) por ser como mi familia en España, por preocuparte por mí en todo momento, por darme ánimos y sobre todo por tanto cariño ique especial eres preciosa!

A mis siempre extrañados Chuchito, Carmencita y Mariangela Ríos porque desde la distancia siempre han deseado lo mejor para mí, ilos amo!

No puedo dejar de mencionar a mis amigos de aventura predoctoral: Regino Villarroel, Encarna Garrido, Sabrina Rodríguez, Bea Álvarez, Benardette Anzola y Ronald Petersen por darme ánimos y hacerme ver que los verdaderos amigos existen.

A mis grandes amigos Arelis García, Gabriela Carruyo, Mitzy Pérez, Pilar Núñez, Luvín Fernández, Adolfo Sulbarán, Jorge Moreira, Janeth Urdaneta, Piero Sganga, Dorian Vivas, María Elena Arriero, Don Pedro Pérez, Dña Lilia Fuenmayor, Yofrank Carrizo y José Bastidas, por brindarme su apoyo en todo momento y hacerme sentir que nunca estuve solo.

Sin duda alguna tengo que agradecer a mis hermanos de comunidad del camino neocatecumenal que siempre me han tenido en sus oraciones, en especial a Elida, Gaby e Isabel Portillo, Juan Diego Moreno, Lisette Socorro, Emilia Ávila, Violeta Reinoso y Xiomara González, gracias por no olvidarme y seguir considerándome vuestro hermano, son para mí una parte importante de mi vida.

A todas aquellas personas que siempre me han tenido presente y que han deseado lo mejor para mí, **iGracias!**

Finalmente a la Universidad del Zulia y a la Facultad de Ciencias Veterinarias, por la financiación y por permitirme vivir esta experiencia profesional.

Índice

| | pág. |
|--|-----------|
| Índice | i |
| Lista de figuras | ix |
| Lista de tablas | xiii |
| Lista de abreviaturas | xvii |
| Resumen | xix |
| Summary | xxiii |
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. El problema de la resistencia a los antimicrobianos | 3 |
| 1.2. Antimicrobianos y generalidades de las resistencias antimicrobianas | 8 |
| 1.2.1. Elementos genéticos de transferencia horizontal | 10 |
| 1.2.1.1. Plásmidos | 11 |
| 1.2.1.2. Elementos transponibles | 12 |
| 1.2.1.3. Integrones y casetes genéticos | 14 |
| 1.2.1.3.1. Integrones de clase 1 | 15 |
| 1.2.1.3.2. Integrones de clase 2 | 15 |
| 1.2.1.3.3. Integrones de clase 3 | 16 |
| 1.2.1.3.4. Integrones de clase 4 y 5 | 16 |
| 1.3. Mecanismos de acción y de resistencia a los antimicrobianos | 16 |
| 1.3.1. Tetraciclinas | 17 |
| 1.3.2. β -lactámicos | 19 |
| 1.3.3. Aminoglucósidos | 23 |
| 1.3.4. Macrólidos | 24 |
| 1.3.5. Fluoroquinolonas | 25 |
| 1.3.6. Antimicrobianos polipeptídicos | 28 |
| 2. Hipótesis y Objetivos | 31 |
| 3. Material y Métodos | 37 |
| 3.1. Ensayo experimental, toma de muestras y aislamiento e identificación de aislados de <i>Escherichia coli</i> | 39 |
| 3.2. Estudio de la sensibilidad antimicrobiana | 41 |
| 3.2.1. Medios de cultivo utilizados | 41 |
| 3.2.2. Discos con antimicrobianos | 41 |
| 3.2.3. Antibiógramas | 42 |
| 3.3. Detección de genes que codifican resistencia a diferentes antimicrobianos | 43 |

| | |
|---|----|
| 3.3.1. Extracción de ADN | 44 |
| 3.3.2. Oligonucleótidos y condiciones de amplificación | 44 |
| 3.3.3. Electroforesis de corriente continua | 44 |
| 3.3.4. Tinción y visualización | 44 |
| 3.3.5. Detección de genes que codifican resistencia a tetraciclinas | 45 |
| 3.3.6. Detección de genes que codifican resistencia a betalactámicos | 46 |
| 3.3.7. Detección de genes que codifican resistencia a aminoglucósidos | 49 |
| 3.3.8. Resistencia a fluoroquinolonas | 50 |
| 3.3.8.1. Detección de sustituciones aminoacídicas en la Región Determinante de Resistencia a Quinolonas (QRDR) de <i>gyrA</i> y <i>parC</i> (ADN girasa y topoisomerasa IV) | 50 |
| 3.3.8.2. Resistencia a fluoroquinolonas mediada por plásmidos | 52 |
| 3.4. Estudio de los perfiles REP y de las relaciones clonales entre los aislados de <i>E. coli</i> | 54 |
| 3.4.1. Extracción del ADN | 54 |
| 3.4.2. Oligonucleótidos y reacción de REP-PCR | 55 |
| 3.4.3. Análisis de los perfiles REP | 56 |
| 3.5. Determinación de grupos filogenéticos de los aislados de <i>E. coli</i> | 56 |
| 3.6. Estudio de la resistencia a antimicrobianos mediada por integrones | 58 |
| 3.6.1. Caracterización de integrones | 58 |
| 3.6.2. Amplificación de la región variable del integrón | 60 |
| 3.6.2.1. Secuenciación y análisis bioinformático | 61 |
| 3.6.3. Detección de los genes <i>qacEΔ1</i> + <i>sul1</i> en integrones de clase 1 defectivos | 61 |
| 3.6.4. PCR para la detección del elemento de inserción IS26 | 63 |
| 3.6.5. Detección del gen <i>sul3</i> | 64 |
| 3.7. Análisis de los resultados | 64 |
| 4. Resultados y Discusión | 65 |
| Capítulo 1. Sensibilidad antimicrobiana y detección de genes de resistencia | 67 |
| 4.1. Aislamiento de cepas | 69 |
| 4.2. Sensibilidad antimicrobiana y genes que codifican resistencia a tetraciclinas | 71 |
| 4.2.1. Estudio de la sensibilidad antimicrobiana a tetraciclinas de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales del grupo control y de los animales tratados según el momento de la toma de la muestra y la pauta de tratamiento con doxiciclina | 71 |

| | |
|---|----|
| 4.2.2. Detección de genes que codifican resistencia a tetraciclinas en aislados de <i>E. coli</i> de conejos | 74 |
| 4.2.2.1. Detección de genes que codifican resistencia a tetraciclinas en los aislados procedentes de los animales del grupo control | 75 |
| 4.2.2.2. Detección de genes que codifican resistencia a tetraciclinas en los aislados procedentes de los animales tratados | 75 |
| 4.3. Sensibilidad antimicrobiana y genes que codifican resistencia a betalactámicos | 79 |
| 4.3.1. Estudio de la sensibilidad antimicrobiana a betalactámicos de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales del grupo control y de los animales tratados según el momento de la toma de la muestra y la pauta de tratamiento con doxiciclina | 79 |
| 4.3.2. Detección de genes que codifican resistencia a betalactámicos en aislados de <i>E. coli</i> de conejos | 80 |
| 4.3.2.1. Detección de genes que codifican resistencia a betalactámicos en los aislados procedentes de los animales del grupo control | 81 |
| 4.3.2.2. Detección de genes que codifican resistencia a betalactámicos en los aislados procedentes de los animales tratados | 81 |
| 4.4. Sensibilidad antimicrobiana y genes que codifican resistencia a aminoglucósidos | 84 |
| 4.4.1. Estudio de la sensibilidad antimicrobiana a aminoglucósidos de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales del grupo control y de los animales tratados según el momento de la toma de la muestra y la pauta de tratamiento con doxiciclina | 84 |
| 4.4.2. Detección de genes que codifican resistencia a aminoglucósidos en aislados de <i>E. coli</i> de conejos | 86 |
| 4.4.2.1. Detección de genes que codifican resistencia a aminoglucósidos en los aislados procedentes de los animales del grupo control | 87 |
| 4.4.2.2. Detección de genes que codifican resistencia a aminoglucósidos en los aislados procedentes de los animales tratados | 87 |
| 4.5. Sensibilidad antimicrobiana y mecanismos de resistencia a macrólidos | 88 |

| | |
|--|-----|
| 4.5.1. Estudio de la sensibilidad antimicrobiana a macrólidos de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales del grupo control y de los animales tratados según el momento de la toma de la muestra y la pauta de tratamiento con doxiciclina | 88 |
| 4.6. Sensibilidad antimicrobiana y mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas | 90 |
| 4.6.1. Estudio de la sensibilidad antimicrobiana a fluoroquinolonas de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales del grupo control y de los animales tratados según el momento de la toma de la muestra y la pauta de tratamiento con doxiciclina | 90 |
| 4.6.2. Caracterización de mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas en aislados de <i>E. coli</i> de conejos | 91 |
| 4.6.2.1. Detección de sustituciones aminoacídicas en aislados de <i>E. coli</i> de los animales del grupo control | 91 |
| 4.6.2.2. Detección de sustituciones aminoacídicas en aislados de <i>E. coli</i> de los animales tratados | 93 |
| 4.6.2.3. Detección de genes que codifican resistencia a fluoroquinolonas mediada por plásmidos | 95 |
| 4.7. Sensibilidad a antimicrobianos polipeptídicos de los aislados de <i>E. coli</i> | 96 |
| 4.8. Evolución de los porcentajes de resistencia frente a los diferentes antimicrobianos a lo largo de las tres etapas del ensayo experimental | 97 |
| 4.9. Estudio de los fenotipos de resistencia antimicrobiana | 100 |
| Capítulo 2. Estudio de perfiles REP y de las relaciones clonales | 103 |
| 4.10. Estudio de perfiles REP y de las relaciones clonales entre los aislados de <i>E. coli</i> de conejos tratados con diferentes pautas de doxiciclina | 105 |
| 4.10.1. Análisis de perfiles REP y su asociación con grupos filogenéticos y fenotipos de resistencia de los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los animales del grupo control | 106 |
| 4.10.2. Análisis de perfiles REP en los animales tratados | 109 |
| 4.10.2.1. Aislados de los animales tratados con 50 mg/L/día de doxiciclina | 109 |
| 4.10.2.2. Aislados de los animales tratados con 100 mg/L/día de doxiciclina | 112 |
| 4.10.2.3. Aislados de los animales tratados con 200 mg/L/día de doxiciclina | 114 |

| | |
|---|---------|
| Capítulo 3. Resistencia antimicrobiana mediada por integrones | 119 |
| 4.11. Estudio de la resistencia antimicrobiana mediada por integrones | 121 |
| 4.11.1. Selección de los aislados | 121 |
| 4.11.2. Detección y caracterización de integrones | 122 |
| 4.11.3. Amplificación de la región variable del integrón | 130 |
| 4.11.4. Asociación entre la presencia de integrones y la resistencia a antimicrobianos | 135 |
| 4.11.5. Identificación de grupos filogenéticos en aislados de <i>E. coli</i> portadores de integrones | 138 |
| 5. Conclusiones | 145 |
| 6. Bibliografía | 149 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|------|
| | pág. |
| Introducción | |
| Figura 1.1. Representación esquemática de un integrón | 15 |
| Material y Métodos | |
| Figura 2.1. Distribución de los animales experimentales según el diseño del ensayo | 39 |
| Figura 2.2. Árbol de decisión dicotómica para determinar el grupo filogenético de aislados de <i>E. coli</i> | 57 |
| Resultados y Discusión | |
| Capítulo 1 | |
| Figura 4.1. Evolución de los porcentajes de resistencia a doxiciclina según el momento de la toma de la muestra y la pauta de tratamiento | 74 |
| Figura 4.2. Evolución de los porcentajes de resistencia a eritromicina según el momento de la toma de la muestra y la pauta de tratamiento | 89 |
| Figura 4.3. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína <i>gyrA</i> de la cepa de <i>E. coli</i> 3321, correspondiente al animal Nº 3 del grupo control y aislada en la fase PT, y la cepa de referencia NP_416734.1 | 92 |
| Figura 4.4. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína <i>parC</i> de la cepa de <i>E. coli</i> 3316, correspondiente al animal Nº 3 del grupo control y aislada en la fase PT, y la cepa de referencia NP_755631.1 | 92 |
| Figura 4.5. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína <i>parC</i> de la cepa de <i>E. coli</i> 3319, correspondiente al animal Nº 3 del grupo control y aislada en la fase PT, y la cepa de referencia NP_755631.1 | 93 |
| Figura 4.6. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína <i>parC</i> de la cepa de <i>E. coli</i> 3606, correspondiente al animal Nº 11 tratado con la dosis alta y aislada en la fase PT, y la cepa de referencia NP_755631.1 | 94 |
| Figura 4.7. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína <i>gyrA</i> de la cepa de <i>E. coli</i> 2626, correspondiente al animal Nº 9 tratado con la dosis media y aislada en la fase AT, y la cepa de referencia NP_416734.1 | 95 |
| Figura 4.8. Evolución de los porcentajes de resistencia a los diferentes antimicrobianos a lo largo de las tres etapas en los animales del grupo control | 98 |
| Figura 4.9. Evolución de los porcentajes de resistencia a los diferentes antimicrobianos a lo largo de las tres etapas en el grupo de los animales tratados con 50 mg/L de doxiciclina | 98 |

Figura 4.10. Evolución de los porcentajes de resistencia a los diferentes antimicrobianos a lo largo de las tres etapas en el grupo de los animales tratados con 100 mg/L de doxiciclina 99

Figura 4.11. Evolución de los porcentajes de resistencia a los diferentes antimicrobianos a lo largo de las tres etapas en el grupo de los animales tratados con 200 mg/L de doxiciclina 100

Capítulo 2

Figura 4.12. Imagen de los productos obtenidos por amplificación por REP-PCR separados electroforéticamente en gel de agarosa al 2% 105

Figura 4.13. Similitud genética entre los aislados de *E. coli* de los animales del grupo control (animales 2, 4 y 5) 108

Figura 4.14. Similitud genética entre los aislados de *E. coli* de los animales tratados con 50 mg/L/d de doxiciclina (animales 17, 18 y 19) 111

Figura 4.15. Similitud genética entre los aislados de *E. coli* de los animales tratados con 100 mg/L/d de doxiciclina (animales 6, 7 y 8) 113

Figura 4.15.1. Similitud genética entre los aislados de *E. coli* de los animales tratados con 100 mg/L/d de doxiciclina (animales 9 y 10) 114

Figura 4.16. Similitud genética entre los aislados de *E. coli* de los animales tratados con 200 mg/L/d de doxiciclina (animales 11, 13 y 14) 116

Capítulo 3

Figura 4.17. Imagen de los productos obtenidos por amplificación por PCR separados electroforéticamente en gel de agarosa al 2% de los genes que codifican la integrasa de los integrones de clase 1 (*intI1*), 2 (*intI2*) y 3 (*intI3*) 123

Figura 4.18. Número de aislados portadores de integrones según momento de la toma de la muestra 125

Figura 4.19. Representación esquemática de la estructura de los integrones de clase 1 y de la composición de casetes genéticos de resistencia analizados por secuenciación en aislados de *E. coli* de conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de doxiciclina 134

Figura 4.20. Representación esquemática de la estructura de los integrones de clase 2 y de la composición de casetes genéticos de resistencia, analizados por secuenciación en aislados de *E. coli* de conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de doxiciclina 135

Figura 4.21. Representación esquemática de la estructura de los integrones de clase 1 truncados por la secuencia de inserción IS26 (integrón de clase 1 no clásico) en aislados de *E. coli* de conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de doxiciclina 135

Figura 4.22. Representación esquemática de la estructura de los integrones de clase 1 no clásicos en aislados de *E. coli* de conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de doxiciclina 135

| | |
|--|-----|
| Figura 4.23. Asociación entre fenotipo de multirresistencia a antimicrobianos y la presencia de integrones de clase 1 en aislados de <i>E. coli</i> de conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de doxiciclina | 136 |
| Figura 4.24. Distribución porcentual de los aislados portadores de integrones analizados en este estudio en los 4 grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> | 139 |
| Figura 4.25. Identificación de grupos filogenéticos en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los conejos del grupo control | 142 |
| Figura 4.26. Identificación de grupos filogenéticos en los aislados de <i>E. coli</i> procedentes de los conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de doxiciclina | 143 |

LISTA DE TABLAS

| | pág. |
|---|------|
| Material y Métodos | |
| Tabla 3.1. Interpretación de los antibiogramas en función del diámetro de los halos de inhibición para los antimicrobianos estudiados | 43 |
| Tabla 3.2. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para la detección de genes que codifican resistencia a tetraciclinas | 45 |
| Tabla 3.3. Cepas empleadas como controles positivos para la detección por PCR de genes que codifican resistencia a tetraciclinas | 46 |
| Tabla 3.4. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para la detección de genes que codifican resistencia a betalactámicos | 47 |
| Tabla 3.5. Cepas empleadas como controles positivos para la detección por PCR de genes que codifican resistencia a betalactámicos | 49 |
| Tabla 3.6. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para la detección de genes que codifican resistencia a aminoglucósidos | 49 |
| Tabla 3.7. Cepas empleadas como controles positivos para la detección por PCR de genes que codifican resistencia a aminoglucósidos | 50 |
| Tabla 3.8. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para los genes <i>gyrA</i> y <i>parC</i> | 51 |
| Tabla 3.9. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para la detección de genes que codifican resistencia a fluoroquinolonas mediada por plásmidos | 52 |
| Tabla 3.10. Cepas empleadas como controles positivos para la detección por PCR de genes que codifican resistencia a fluoroquinolonas | 54 |
| Tabla 3.11. Oligonucleótidos y condiciones de amplificación empleados en la técnica de REP-PCR | 55 |
| Tabla 3.12. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para la determinación de los grupos filogenéticos de aislados de <i>E. coli</i> | 57 |
| Tabla 3.13. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para el estudio de integrones | 59 |
| Tabla 3.14. Cepas empleadas como controles positivos para el estudio de integrones | 60 |
| Tabla 3.15. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para el estudio de la región variable del integrón | 60 |

Tabla 3.16. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para el estudio de los genes *qacEΔ1* + *sul1* 62

Tabla 3.17. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para IS26 63

Tabla 3.18. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para el estudio del gen *sul3* 64

Resultados y Discusión

Capítulo 1

Tabla 4.1. Resultados de los aislamiento de *E. coli* y otras enterobacterias según el animal de procedencia, la pauta de tratamiento y el momento de la toma de la muestra 70

Tabla 4.2. Resultados de la sensibilidad a doxiciclina de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales del grupo control y de los animales tratados según la pauta de tratamiento y el momento de la toma de la muestra 73

Tabla 4.3. Detección de los genes *tet(A)* y *tet(B)* en los aislados procedentes de los animales del grupo control resistentes a tetraciclinas seleccionados 75

Tabla 4.4. Detección de los genes *tet(A)* y *tet(B)* en los aislados procedentes de los animales tratados resistentes a tetraciclinas seleccionados 76

Tabla 4.5. Resultados de la sensibilidad a amoxicilina de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales del grupo control y de los animales tratados según la pauta de tratamiento y el momento de la toma de la muestra 80

Tabla 4.6. Detección del gen *bla_{TEM}* en los aislados procedentes de los animales del grupo control resistentes a betalactámicos seleccionados 81

Tabla 4.7. Detección de los genes *bla_{TEM}* y *bla_{CTX-M-9}* en los aislados procedentes de los animales tratados resistentes a betalactámicos seleccionados 82

Tabla 4.8. Resultados de la sensibilidad a gentamicina de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales del grupo control y de los animales tratados según la pauta de tratamiento y el momento de la toma de la muestra 86

Tabla 4.9. Detección de los genes *aac(3)-IIa* y *aac(3)-IVa* en los aislados procedentes de los animales tratados resistentes a aminoglucósidos seleccionados 88

Tabla 4.10. Resultados de la sensibilidad a eritromicina de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales del grupo control y de los animales tratados según la pauta de tratamiento y el momento de la toma de la muestra 89

Tabla 4.11. Resultados de la sensibilidad a enrofloxacin de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales del grupo control y de los animales tratados según la pauta de tratamiento y el momento de la toma de la muestra 90

Tabla 4.12. Detección de sustituciones aminoacídicas de la QRDR de los genes *gyrA* y *parC* de los aislados resistentes procedentes de los animales del grupo control según el momento de la toma de la muestra 91

Tabla 4.13. Detección de sustituciones aminoacídicas de la QRDR de los genes *gyrA* y *parC* de los aislados resistentes procedentes de los animales tratados según el momento de la toma de la muestra 93

Tabla 4.14. Detección de sustituciones aminoacídicas de la QRDR de los genes *gyrA* y *parC* de los aislados intermedios procedentes de los animales tratados según el momento de la toma de la muestra 95

Tabla 4.15. Fenotipos de resistencia antimicrobiana de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales del grupo control según el momento de la toma de la muestra 101

Tabla 4.16. Fenotipos de resistencia antimicrobiana de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados según el momento de la toma de la muestra 102

Capítulo 3

Tabla 4.17. Distribución de los 69 aislados de *E. coli* multirresistentes según el animal de procedencia, el momento de la toma de la muestra y la pauta de tratamiento con doxiciclina 121

Tabla 4.18. Caracterización de integrones de clase 1 en los aislados de *E. coli* de conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de doxiciclina 127

Tabla 4.19. Resistencia a antimicrobianos de los aislados de conejo de *E. coli* de conejos portadores de integrones y aislados con integrasa truncada (integrones no clásicos) 137

Tabla 4.20. Identificación de grupos filogenéticos en los aislados de *E. coli* con integrones clase 1 (*intI1*) y clase 2 (*intI2*) 140

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|--|
| <i>aad</i> | Gen que codifica un aminoglucósido adeniltransferasa |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AMX | Amoxicilina |
| Asn | Asparagina |
| Asp | Ácido Aspártico |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> (Colección Americana de cultivos tipo) |
| <i>attc</i> | Sitio de recombinación específica de los casetes genéticos |
| <i>attI</i> | Sitio de recombinación específica de la integrasa |
| BLEE | Betalactamasas de Espectro Extendido |
| °C | Grado centígrado |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio) |
| CS | <i>Conserved Segment</i> (Segmento Conservado) |
| <i>dfrA</i> | Gen que codifica una dihidrofolato reductasa |
| dNTPs | Desoxinucleótidos |
| DOX | Doxiciclina |
| EDTA | <i>EthyleneDiamine TetraAcetic acid</i> (Ácido etilen-diamino-tetra-acético) |
| ERI | Eritromicina |
| ENR | Enrofloxacin |
| FAO | <i>Food and Agriculture Organisation of the United Nations</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) |
| g | Gramo |
| GEN | Gentamicina |
| Glu | Ácido Glutámico |
| Gly | Glicina |
| <i>intI</i> | Gen que codifica una integrasa |
| <i>intI1</i> | Gen que codifica una integrasa clase 1 |
| <i>intI2</i> | Gen que codifica una integrasa clase 2 |
| <i>intI3</i> | Gen que codifica una integrasa clase 3 |
| IS | <i>Insertion Sequence</i> (Secuencia de Inserción) |
| Ile | Isoleucina |
| Kg | Kilogramo |
| L | Litro |
| LBA | Luria Bertani Agar |
| Leu | Leucina |
| mg | Miligramo |
| MgCl ₂ | Cloruro de Magnesio |
| MHA | Mueller Hinton Agar |
| min | Minuto |
| ml | Mililitro |

| | |
|---------------|---|
| mM | Milimolar |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) |
| OIE | <i>World Organisation for Animal Health</i> (Organización Mundial de Sanidad Animal) |
| <i>orf</i> | <i>Open Reading frame</i> (Marco de lectura abierto) |
| pb | Pares de bases |
| PBPs | <i>Penicillin Binding Protein</i> (Proteínas Fijadoras de Penicilinas) |
| Pc | Promotor de los genes casetes de los integrones de clase 1 |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa) |
| Phe | Fenilalanina |
| pv | Peso vivo |
| <i>qacEΔ1</i> | Gen que codifica una proteína de resistencia a los compuestos de amonio cuaternario |
| QRDR | <i>Quinolone Resistance-Determining Region</i> (Región Determinante de Resistencia a Quinolonas) |
| REP | <i>Repetitive Extragenic Palindromic Sequence</i> (Elementos Extragénicos Palindrómicos Repetitivos) |
| <i>sat</i> | Gen que codifica una estreptotricina acetiltransferasa |
| seg | Segundos |
| Ser | Serina |
| SPSS | <i>Statistical Package for the Social Sciences</i> (Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales) |
| <i>sul1</i> | Gen que codifica una dihidropteroato sintetasa tipo 1 |
| <i>sul2</i> | Gen que codifica una dihidropteroato sintetasa tipo 2 |
| <i>sul3</i> | Gen que codifica una dihidropteroato sintetasa tipo 3 |
| SXT | Trimetoprim-sulfametoxazol |
| TET | Tetraciclina |
| Tn | Transposón |
| U | Unidades |
| UFC | Unidades Formadoras de Colonias |
| μg | Microgramo |
| μl | Microlitro |
| μM | Micromolar |
| UPGMA | <i>Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean</i> (Método del promedio entre grupos) |
| WHO | <i>World Organisation Health</i> (Organización Mundial de la Salud) |

RESUMEN

La resistencia a antimicrobianos constituye actualmente un problema de gran impacto en Salud Pública. El excesivo uso de antimicrobianos en medicina humana y veterinaria y en agricultura ha originado un incremento continuo de fracasos en la terapia antimicrobiana debido al aumento y diversidad de microorganismos resistentes.

La evaluación del riesgo del desarrollo de resistencias cobra especial interés cuando se utilizan pautas de administración por vía oral en animales de abasto, por cuanto implica el contacto directo del antimicrobiano con bacterias que forman parte de la microbiota intestinal. Y ello teniendo en cuenta además, que el intestino puede ser un hábitat adecuado para el posible intercambio de material genético y, por lo tanto, de resistencias entre bacterias de igual o diferente especie.

En el presente trabajo se planteó la hipótesis de que la combinación dosis-duración del tratamiento con doxiciclina por vía oral influye sobre el desarrollo y/o selección de bacterias resistentes en la microbiota intestinal y para contrastarla se utilizó como modelo animal el conejo y como prototipo de bacteria *Escherichia coli*. En otras palabras se pretendía evaluar el riesgo de desarrollo o selección de *E. coli* resistentes en conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de doxiciclina.

Los animales experimentales se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos experimentales de 5 conejos cada uno en función de la dosis de doxiciclina administrada vía oral por litro de agua de bebida y según el tiempo de tratamiento, quedando conformados por un grupo de animales control, un grupo de animales tratados con la dosis terapéutica de 100 mg de doxiciclina durante 6 días, un grupo de animales tratados con la dosis subterapéutica de 50 mg de doxiciclina durante 12 días y un grupo de animales tratados con 200 mg de doxiciclina durante 3 días.

Las muestras fecales se recogieron antes de iniciar el tratamiento (AT), luego de finalizado el tratamiento (FT) y transcurridas 4 semanas desde la finalización del tratamiento (PT). En el grupo control las muestras se tomaron en los mismos tiempos que en el grupo de animales tratados con la pauta estándar o dosis terapéutica.

Al estudiar y comparar el efecto de la administración del tratamiento sobre los patrones de sensibilidad frente a doxiciclina, amoxicilina y gentamicina, se observó que la evolución en los porcentajes de resistencia a estos antimicrobianos a lo largo del ensayo no estuvo asociada a la pauta terapéutica.

La detección por PCR de algunos de los genes implicados en los mecanismos de resistencia frente a antimicrobianos reveló, que la microbiota intestinal habitual de los conejos puede desempeñar un papel importante como reservorio de genes de resistencia a tetraciclina. En virtud del alto porcentaje de aislados portadores del gen *bla*_{TEM} tanto en los animales control como en los tratados, así como el bajo porcentaje de *bla*_{CTX-M-9} detectado en nuestro estudio, podría decirse que los aislados comensales de *E. coli* de la microbiota intestinal de los conejos son un reservorio de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs).

El análisis de las mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* de los aislados de *E. coli* de los animales estudiados reveló que todos los aislados resistentes a fluoroquinolonas y que pertenecían a la fase de PT poseían las mutaciones típicas de estos genes publicadas en otros estudios.

No se detectaron aislados portadores de los genes *qnr* por lo que se podría pensar que estos genes no juegan un papel importante en la selección de aislados resistentes a fluoroquinolonas mediada por plásmidos en conejos.

El tratamiento con doxiciclina originó un cambio en las poblaciones de *E. coli* predominantes en la microbiota intestinal de los conejos, favoreciendo en algunos casos el desarrollo de una población homogénea desde el punto de vista genotípico con un fenotipo de resistencia predominante: DOXICICLINA-ERITROMICINA (DOX-ERI).

La técnica de PCR permitió detectar integrones en 56 de los 69 (81,1%) aislados comensales multirresistentes analizados procedentes de 11 animales y en los que se detectó mayoritariamente el gen que codifica la integrasa clase 1 (*intI1*). Estos aislados se encontraron básicamente en la fase posterior al tratamiento. El gen *intI2* junto con el *intI1* solo se detectó en un aislado en la fase posterior al tratamiento o PT. No se detectaron integrones de clase 3 en este estudio.

Se encontró poca diversidad de genes de resistencia a antimicrobianos detectados en las regiones variables de los integrones caracterizados.

La identificación de los grupos filogenéticos en los aislados de *E. coli* multirresistentes de conejos, reveló que los grupos detectados con mayor frecuencia fueron el D (62,5%) y el B2 (16%).

En definitiva, en este estudio no se consiguió demostrar la hipótesis propuesta de que la combinación dosis-duración del tratamiento con doxiciclina por vía oral influye sobre el desarrollo y/o selección de bacterias resistentes utilizando como modelo animal el conejo y como prototipo de bacteria *E. coli*. Y ello debido, seguramente, al alto porcentaje de aislados de *E. coli* resistentes a este antimicrobiano presentes en la microbiota intestinal antes del tratamiento. En otras palabras, el modelo propuesto no permitió, como inicialmente se pretendía, evaluar el riesgo de desarrollo o selección de *Escherichia coli* resistentes.

SUMMARY

The resistance to antimicrobial at the moment constitutes a problem of great impact in Public Health. The excessive use of antimicrobial in human and veterinary medicine and agriculture has originated a continuous increase of failures in the antimicrobial therapy due to the increase and diversity of resistant microorganisms.

Risk evaluation of the development of resistance receives special interest when oral administration is used in drugs given to farm animals, inasmuch as it implies the direct bonding of the antimicrobial drug with bacteria that comprise of intestinal microbiota. In addition, the intestine can be a habitat adapted for the possible interchange of genetic material and, therefore, of resistance between bacteria of equal or different species.

In the present work the hypothesis proposed that the combination dose-duration of the treatment with doxycycline per os (PO) influences the development and/or selection of resistant bacteria in the intestinal microbiota, to work on the hypothesis animals used as models were rabbits and as prototype bacteria *Escherichia coli*. In other words it was tried to evaluate the risk of development or selection of *E. coli* resistant bacteria in rabbits treated with different doses of doxycycline.

The experimental animals were randomly distributed in four experimental groups of 5 rabbits each one, based each group on the dose of doxyciclin administered and the duration of the treatment, finally the five groups were conformed by a control group, a group of animals treated with a therapeutic dose of doxyciclin consisting in 100 mg for 6 days, a group treated with sub therapeutic dose of doxyciclin of 50 mg during 12 days and a group treated with 200 mg of doxycycline during 3 days. The fecal samples were taken before initiating the treatment (BT), after finalized the treatment (AT) and 4 weeks post treatment (PT). In the group control the samples were taken at the same times that in the rest of the groups.

When studying and comparing the effect of the administration of the treatment with doxycycline, amoxcillin and gentamicin over the patterns of sensitivity, it was observed that the evolution in the percentage of resistance to these antimicrobial, was not associated to the therapeutic guideline throughout the test.

The detection by PCR of some of the genes responsible in the mechanisms of resistance against the antimicrobial revealed, that normal intestinal microbiota of rabbits can play an important role as reservoir of genes of resistance to tetracycline. Due to the high percentage of isolated carriers of the gene *bla*_{TEM}, as much in the control animals as in treated, as well as the low percentage of *bla*_{CTX-M-9}

detected in our study, could mean that the isolated dependants of *E. coli* in the intestinal microbiota of the rabbits is a reservoir of betalactamases of extended spectrum (BLEEs).

The analysis of the mutations in the genes *gyrA* and *parC* of the isolated of *E. coli* in the studied animals revealed that all isolated resistant to fluoroquinolones and that belonged to the PT group had typical mutations of these genes published in other studies.

Isolated carriers of the genes *qnr* were not detected, there for it would be possible to think that these genes do not play an important role in the selection of isolated resistant to fluoroquinolones mediated by plasmids in rabbits.

The treatment with doxycycline originated a change in the populations of *E. coli* in intestinal microbiota of the rabbits, favoring in some cases the development of a homogenous population from a genotypic point of view with a phenotype of predominant resistance: DOXYCYCLINE-ERYTHROMYCIN (DOX-ERY).

The PCR technique allowed to detect integrons in 56 of 69 (81.1%) of the multiresistant dependants isolated analyzed coming from 11 animals, in which the gene detected mainly is the one that codifies integrase class 1 (*intI1*). These isolated basically were in the phase subsequent to the treatment (PT). The gene *intI2* along with *intI1* were detected in isolated in the phase subsequent to a treatment or PT. Not integrons were detected on class 3 in this study.

There was little diversity of the detected genes for resistance to antimicrobial in the characterized variable regions of integrons.

The identification of the filogenetics groups in the isolated multiresistant *E. coli* of rabbits revealed that the most frequently detected groups were D (62.5%) and B2 (16%).

In this study the propose hypothesis that the combination dose-duration of the treatment with doxiciclin PO influences the development and/or selection of resistant bacteria using like model animal the rabbit and prototype of bacterium *E. coli* was not demonstrated. This probably due, surely, to the high percentage of isolated *E. coli* resistant to this antimicrobial present in the intestinal microbiota before the treatment. In other words, the proposed model did not allow, to evaluate the risk of development or selection of resistant *Escherichia coli*.

1 – Introducción

“La paciencia es un árbol de raíz amarga pero de frutos muy dulces”.

Proverbio persa

1.1. EL PROBLEMA DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

Las resistencias antimicrobianas constituyen un problema de gran impacto en Salud Pública alcanzando elevadas proporciones en los últimos años. Numerosas publicaciones han destacado la posible relación entre el uso imprudente o la sobreutilización de antimicrobianos en animales y el incremento de resistencias a dichos compuestos en bacterias de importancia en patología humana y animal (Neu, 1992; Piddock, 1996; Witte, 1998; Mellon y col., 2001), originando el incremento continuo de fracasos terapéuticos debido al aumento en número y diversidad de microorganismos resistentes (Livermore, 2003).

Por otra parte, al administrar las sustancias antimicrobianas por vía oral, las bacterias que forman parte de la microbiota intestinal parecen ser fundamentales dentro del proceso de adquisición y de transferencia interbacteriana de genes codificadores de resistencia, ya que son las que se encuentran expuestas a la presión selectiva ejercida por la administración del antimicrobiano (Nijsten y col., 1994; Bartoloni y col., 2006). De esta forma, tras un tratamiento con sustancias antimicrobianas pueden permanecer en el tracto gastrointestinal bacterias resistentes que en un momento dado pueden provocar un cuadro patológico o bien transferir sus elementos de resistencia a otras bacterias patógenas que colonicen el intestino (Nijsten y col., 1994; Bartoloni y col., 2006). Por ello, estos microorganismos comensales pueden ser útiles a la hora de estimar la presión selectiva ejercida por la administración de antimicrobianos y la consecuente aparición de resistencias en microorganismos patógenos (van den Bogaard y Stobberingh, 2000).

Escherichia coli está presente en diferentes nichos ecológicos y se ha descrito como microorganismo comensal o patógeno en personas y animales. En el tracto digestivo, las cepas comensales se localizan principalmente en el ciego y en el colon, específicamente en la capa mucosa que recubre las células epiteliales, siendo continuamente eliminadas al lumen intestinal y excretadas al exterior a través de las heces (Tenaillon y col., 2010). Este microorganismo es responsable de enfermedades intestinales y extraintestinales en personas así como de infecciones en el medio intrahospitalario (Rodríguez-Baño y col., 2006). En animales de abasto y de compañía *E. coli* participa en el síndrome diarreico en conejos (De Rycke y col., 1997; Urumova y Petrov, 2008; Blanco y col., 2009; Poeta y col., 2009), ganado porcino, bovino y ovino, y perros y causa infecciones extraintestinales en perros y gatos, rumiantes y cerdos e infecciones respiratorias y septicemia en aves (Blanco y col., 2009).

E. coli ha sido comúnmente utilizada como indicador o modelo en estudios sobre los niveles de resistencia a antimicrobianos en poblaciones bacterianas que conforman la microbiota intestinal en animales domésticos (Aarestrup y col., 1998; van den Bogaard y Stobberingh, 2000; Sorum y Sunde, 2001). Algunos estudios epidemiológicos se desarrollaron con aislados comensales y patógenos de *E. coli* para identificar los determinantes genéticos de resistencia. Estos estudios han proporcionado un análisis de la epidemiología descriptiva y molecular de las bacterias fecales de animales resistentes a antimicrobianos (Lanz y col., 2003; Boerlin y col., 2005; Guerra y col., 2006; Sawant y col., 2007). Asimismo, se ha demostrado la relación entre el uso de antimicrobianos en animales de abasto y el incremento de la presencia de aislados bacterianos resistentes en el tracto digestivo de los animales (Gellin y col., 1989; Sunde y col., 1998; Blake y col., 2003). Sin embargo, los procesos subyacentes a la aparición y propagación de estas bacterias resistentes a los antimicrobianos son poco conocidos, y el cómo estos aislados son seleccionados por la administración de antimicrobianos en el ecosistema intestinal aún no está claro (Bibbal y col., 2009).

En el pasado, el uso de los antimicrobianos como promotores del crecimiento en animales destinados al consumo humano así como el escaso control en su utilización y del riesgo sanitario de dicho uso, generaron serias preocupaciones sobre su posible contribución en la presencia de bacterias resistentes en las personas (Bryan y col., 2004). Hay que mencionar que las partes implicadas: ganaderos, industria farmacéutica y de producción de piensos, veterinarios, médicos y científicos en general, tuvieron opiniones diferentes respecto de la conveniencia o no del empleo de antimicrobianos como promotores del crecimiento en explotaciones ganaderas, llegando a discrepar en tan intrincado problema y de tan grandes repercusiones económicas y sanitarias.

La propiedad de los antimicrobianos de mejorar las tasas de crecimiento animal se conoce desde finales de los años cuarenta del pasado siglo, cuando se observó que las aves alimentadas con productos de la fermentación de *Streptomyces aureofaciens* mejoraban su desarrollo. Se identificó el factor de crecimiento en dichos extractos como residuos de clortetraciclina. Posteriormente se confirmó esta propiedad en múltiples antimicrobianos y para diversas especies animales. Los antimicrobianos como promotores del crecimiento se han empleado a dosis subterapéuticas durante largos períodos de la vida del animal, aumentando el crecimiento promedio diario y los índices de conversión de alimentos a razón de 3% a 11%. El mecanismo por el cual los antimicrobianos favorecen el crecimiento no se conoce con exactitud. Básicamente actúan modificando cuantitativa y

cualitativamente la microbiota intestinal, provocando una disminución de los microorganismos causantes de enfermedades subclínicas. Asimismo, actúan reduciendo la microbiota normal que compite con el hospedador por los nutrientes. Todo ello conduce a una mejora en la productividad y reduce la mortalidad de los animales.

Desde la década de los cincuenta, la adición de antimicrobianos en pequeñas dosis al pienso de los animales de abasto ha venido siendo una práctica habitual para mejorar los índices de producción (Dibner y Richards, 2005). En aquel entonces no se tuvo en cuenta el efecto que el consumo de estos “factores nutritivos”, como se les consideró en un principio, pudiera tener sobre la resistencia bacteriana. A finales de los sesenta surgieron las primeras alertas sobre el incremento de las resistencias y la posible relación con el consumo de antimicrobianos como promotores del crecimiento (Barnes, 1958; Elliott y Barnes, 1959). Cabe recordar que el tema de la resistencia a los antimicrobianos en los animales y la posibilidad de su transferencia a las personas se abordó y se publicó en el llamado informe británico Swann (Swann y col., 1969), donde se formularon varias recomendaciones que si se hubiesen acatado rigurosamente, habría menos preocupación por este problema en el Reino Unido y posiblemente en otros países.

En algunos estudios se ha demostrado una disminución de las resistencias bacterianas observadas en los animales de abasto al abolir la administración de sustancias antimicrobianas como promotores de crecimiento en dichos animales (Aarestrup y col., 2001; Casewell y col., 2003). En este sentido, en el Reglamento (CE) Nº 1831/2003, del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal, se establece que *“la comercialización y la utilización como aditivos para la alimentación animal de antimicrobianos distintos de los coccidiostáticos y los histomonóstatos, sólo podrá efectuarse hasta el 31 de diciembre de 2005; a partir del 1 de enero de 2006, estas sustancias se eliminarán del registro”*.

Casewell y col. (2003) señalan que después de la retirada de los antimicrobianos empleados como promotores del crecimiento, el bienestar animal se ha visto afectado y a pesar de los esfuerzos para mejorar otros aspectos de la ganadería, el uso veterinario de antimicrobianos terapéuticos, que son idénticos a los utilizados en medicina humana, se ha incrementado, y esto constituye un riesgo teórico para la salud humana en relación con la resistencia de *Salmonella*, *Campylobacter* y cepas zoonóticas de *E. coli*. Según estos autores, los esfuerzos y gastos que conlleva la imposición de la prohibición habría sido mejor invertidos en

lograr un uso racional de los antimicrobianos en personas y animales, y en un esfuerzo mucho mayor para entender el complejo epidemiológico de patógenos resistentes y genes de resistencia.

En los últimos años se han creado en diferentes países de la Unión Europea redes de vigilancia de las resistencias a antimicrobianos en bacterias de origen tanto animal como humano con el objetivo de cuantificar la magnitud del problema de la resistencia a los antimicrobianos, hacer un seguimiento de la evolución de dicha resistencia a lo largo de los años y determinar el efecto de determinadas políticas del uso de estos compuestos en animales. En este sentido, en España se creó en 1997 la red de vigilancia veterinaria de resistencia a antimicrobianos (VAV), financiada por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y que tiene su sede en el Departamento de Sanidad Animal de la Universidad Complutense de Madrid (Moreno y col., 2000).

En octubre de 1997, la Organización Mundial de la Salud convocó un comité multidisciplinario con la denominación de "*Repercusiones médicas del uso de antimicrobianos en animales domésticos destinados al consumo*", que se reunió en la ciudad de Berlín y en el que se llegó a la conclusión de que la exposición prolongada a niveles bajos de antimicrobianos puede tener un mayor potencial selectivo que el empleo de dosis completas administradas por corto tiempo con fines terapéuticos. Este hecho, basado en un principio de prudencia, ha conducido a la prohibición en toda la Unión Europea a partir del año 2006 de la utilización de cualquier antimicrobiano a dosis subterapéuticas con fines productivos.

Siempre ha sido difícil obtener pruebas sólidas de que la resistencia a los antimicrobianos en bacterias de origen animal contribuye a este mismo fenómeno en las personas. No obstante, cada día es mayor el número de investigaciones que aportan pruebas de la transferencia de resistencias desde las bacterias animales a las del hombre.

En el presente trabajo se plantea un ensayo experimental *in vivo* en el que se utiliza *E. coli* como modelo de bacteria gramnegativa que forma parte de la microbiota habitual del intestino de los gazapos, para evaluar el efecto de la administración por vía oral con diferentes pautas de doxiciclina sobre la selección de aislados de *E. coli* resistentes frente a diferentes antimicrobianos.

Este ensayo experimental forma parte de un proyecto de investigación más amplio ejecutado en colaboración con el CReSA (Centre de Recerca en Sanitat Animal, Barcelona), con el que se pretendió analizar *in vivo* y en condiciones

controladas de experimentación el riesgo de aparición de resistencias a antimicrobianos en bacterias intestinales de pollos, cerdos y conejos tras la administración por vía oral de diferentes pautas de tratamiento con enrofloxacin en el caso de los pollos, colistina en cerdos y doxiciclina en conejos, antimicrobianos estos que se seleccionaron en función de sus características farmacocinéticas, farmacodinámicas y mecanismos de resistencia. Asimismo, el diseño y ejecución de un modelo experimental sencillo, y de una metodología sistemática de laboratorio que permitiera evaluar el riesgo de aparición de resistencias, podría tener cierta relevancia como alternativa para llevar a cabo los estudios propuestos en la Guía EMEA/CVMP/244/01 de la Agencia Europea de Medicamentos, sancionada por la Agencia Española del Medicamento, y que entró en vigor en el año 2003.

En la actualidad, el conocimiento del comportamiento terapéutico de los antimicrobianos pasa por la realización de los estudios farmacocinéticos en los que se valora la concentración del principio activo en un determinado órgano o tejido cuando se suministra una determinada cantidad diaria durante un período de tiempo definido (Baggot, 2001). Estos estudios farmacocinéticos permiten inferir, al combinar sus datos con los del grado de sensibilidad de los microorganismos, si es previsible obtener o no un efecto positivo con la pauta terapéutica establecida. No obstante, y aunque los parámetros farmacocinéticos son útiles para conocer el grado de eficacia esperado, no aportan información del riesgo de generación, selección o persistencia de cepas resistentes como resultado del tratamiento con antimicrobianos, por lo que se hace imprescindible el establecimiento de nuevas pautas terapéuticas conducentes a minimizar este riesgo. Además, los conocimientos de farmacocinética, farmacodinamia y de mecanismo de resistencia deben complementarse con una adecuada política de educación de todos los profesionales de la Salud Pública y de la Medicina Veterinaria, haciendo énfasis en el concepto interdisciplinario e intersectorial del uso racional de los antimicrobianos como elemento clave para lograr una reducción de los niveles de resistencia antimicrobiana (FEDESA, 1999).

Los datos sobre el uso de antimicrobianos juegan un papel importante en el desarrollo de políticas nacionales e internacionales para la disminución de la resistencia antimicrobiana. Por consiguiente, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Mundial de Sanidad Animal (anteriormente Oficina Internacional de Epizootias) y la Organización Mundial de la Salud (WHO) han recomendado que cada país debería implementar un programa de seguimiento bajo la responsabilidad del organismo o de la

autoridad nacional competente para valorar el uso de los agentes antimicrobianos en los animales (WHO, 1997; Nicholls y col., 2001; WHO, 2002, 2003).

Los objetivos del seguimiento del uso de antimicrobianos en animales son múltiples, y los datos obtenidos de éste pueden ser usados i) para comparar el uso de antimicrobianos entre y dentro de los países y entre períodos de tiempo; ii) para facilitar la interpretación de los patrones y tendencias relativas a resistencia a los antibióticos y sus residuos, iii) como una base para la evaluación de riesgos relacionados con la resistencia a los antimicrobianos y sus residuos, iv) como base para las decisiones relativas a las medidas de control, v) como base para la evaluación de la eficacia de las medidas de control que se apliquen, vi) para valorar la propagación y los efectos de la contaminación del medio ambiente con medicamentos, vii) como una base para enfocar la investigación y el desarrollo, y viii) como base para el desarrollo de políticas dirigidas a la contención de la resistencia a los antimicrobianos (WHO, 2003).

Finalmente, es cada vez más necesario abordar el problema de la resistencia antimicrobiana desde una perspectiva ecológica que permita comprender el efecto medio ambiental de los agentes biocidas (antimicrobianos, detergentes/antisépticos, metales pesados y sustancias orgánicas tóxicas) como agentes modificadores de la estructura poblacional de los microorganismos, alterando la biodiversidad en distintos nichos ecológicos y eventualmente influyendo sobre la aceleración adaptativa y en última instancia sobre la evolución de las bacterias (Novais, 2010).

1.2. ANTIMICROBIANOS Y GENERALIDADES DE LAS RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS

Los antimicrobianos pueden agruparse atendiendo a diversos criterios tales como estructura química, mecanismo de acción, espectro de actividad o efecto antimicrobiano.

Según su estructura química pueden clasificarse en betalactámicos, aminoglucósidos, glicopéptidos, rifampicinas, tetraciclinas, macrólidos, quinolonas, sulfamidas, fenicoles, entre otros.

De acuerdo a su mecanismo de acción, los agentes antimicrobianos se clasifican en:

- **Inhibidores de la síntesis de los ácidos nucleicos.** Dentro de este grupo se incluyen las sulfamidas y el trimetoprim que impiden la síntesis del folato. Las sulfamidas son antagonistas del ácido para-aminobenzoico (PABA), necesario para la síntesis del ácido fólico (Martín-Jimenez, 2002), y el trimetoprim inhibe a la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) involucrada en la transformación del ácido dihidrofólico en ácido tetrahidrofólico. Estos antimicrobianos conjuntamente inhiben de forma secuencial la síntesis del ácido tetrahidrofólico bacteriano, precursor de las purinas y los ácidos nucleicos y, consecuentemente, alteran la síntesis de proteínas y los mecanismos de replicación bacteriana. También pertenecen a este grupo las quinolonas y la novobiocina que actúan directamente en la cadena de ADN.
- **Antimicrobianos que interfieren en la síntesis de la pared celular bacteriana.** Estos antimicrobianos actúan bloqueando la síntesis de peptidoglicanos y provocando la muerte bacteriana por un efecto osmótico. Se incluyen en este grupo los β -lactámicos y los glucopéptidos.
- **Inhibidores de la síntesis de proteínas.** Actúan uniéndose al complejo ribosomal-mRNA deteniendo la síntesis proteica. Pertenecen a este grupo las tetraciclinas, aminoglucósidos, fenicoles, estreptograminas, ácido fusídico, lincosamidas y los macrólidos.
- **Inhibidores de la membrana celular.** A este grupo pertenecen las polimixinas que actúan como detergentes catiónicos, rompiendo la membrana citoplasmática de la célula, al atacar los grupos fosfato expuestos de la membrana fosfolipídica.

En función al espectro de actividad se han clasificado en antimicrobianos de amplio y reducido espectro, y por su efecto sobre el crecimiento de las bacterias se clasifican en bactericidas o bacteriostáticos.

Las resistencias antimicrobianas pueden ser de tipo natural cuando las bacterias carecen de la molécula diana a la que se une el antimicrobiano y, en consecuencia, afecta a todas las bacterias de una misma especie o género. Un ejemplo de esto es la resistencia de *Pseudomona aeruginosa* a las bencilpenicilinas y trimetoprim sulfametoxazol (Sussmann y col., 2002). En otros casos la resistencia puede ser adquirida y aparece únicamente en algunas poblaciones dentro de una determinada especie. Este tipo de resistencia aparece por mutaciones en el ADN o por la adquisición de material genético exógeno a través de plásmidos, transposones o integrones (Sussmann y col., 2002).

Los mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias a los antimicrobianos están basados, en general, en uno o varios de los siguientes mecanismos que pueden coexistir en la misma bacteria (French y Phillips, 1997; Levy, 1998; Walsh, 2003):

- **Inactivación del antimicrobiano.** La inactivación se produce por la producción de enzimas codificadas por genes cromosómicos o extracromosómicos que alteran la estructura química del antimicrobiano. Son ejemplo de este mecanismo la producción de β -lactamasas, enzimas modificadoras de aminoglucósidos y de cloranfenicol, así como de tetraciclinas y macrólidos.
- **Modificación de las moléculas dianas.** Estas modificaciones normalmente se deben a mutaciones que alteran el sitio de unión de los antimicrobianos, impidiendo así su actividad. Ejemplos de este mecanismo serían la alteración de las proteínas fijadoras de penicilinas (PBPs) en el caso de la resistencia a los betalactámicos, la alteración de la ADN girasa en el caso de la resistencia a las quinolonas y las alteraciones en el ARNr 23S en el caso de los macrólidos.
- **Disminución de la permeabilidad celular.** Este mecanismo puede afectar a muchas clases de antimicrobianos simultáneamente, produciendo una resistencia múltiple tanto a agentes hidrofílicos, tales como cloranfenicol, trimetoprim, tetraciclina y quinolonas, como a los compuestos betalactámicos como consecuencia de la disminución de la entrada del antimicrobiano causada por mutaciones de los genes que codifican las porinas de la pared celular (especialmente las denominadas OmpF) o debido a la presencia de proteínas de membrana especializadas que disminuyen no solamente la entrada del antimicrobiano sino que a su vez las bacterias reducen la concentración del antimicrobiano y se promueve la expulsión activa del mismo.
- **Expulsión de agentes antimicrobianos.** El desalojo se realiza mediante transportadores o bombas de expulsión activas ubicadas en la membrana interna de los microorganismos que impiden que el antimicrobiano se acumule en el interior de la célula sacándolo fuera de ésta. La resistencia a tetraciclinas y quinolonas puede ser debida a este mecanismo.

1.2.1. Elementos genéticos de transferencia horizontal

La transferencia horizontal parece tener un papel crucial en la adaptación bacteriana a nichos ecológicos específicos y en la diseminación y la persistencia de la resistencia a antimicrobianos entre miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Bennett, 2004). La estructura modular de los elementos de transferencia

horizontal favorece el intercambio entre distintos elementos genéticos, dotando de una gran plasticidad a las poblaciones bacterianas (Osborn y Boltner, 2002; Toussaint y Merlin, 2002). Recientemente se ha sugerido que la transferencia horizontal ocurre entre microorganismos que comparten características similares como el tamaño del genoma o su contenido en guanina/citosina (G+C) (Jain y col., 2003).

Entre los principales elementos genéticos asociados a la diseminación de las resistencias a antimicrobianos en *Enterobacteriaceae* se encuentran los plásmidos, los transposones y los genes casetes en integrones, que hacen posible la transmisión de la resistencia entre bacterias y que incluso pueden pertenecer a géneros o especies diferentes (Carattoli, 2001; Sunde y Sorum, 2001). Además, en un mismo elemento genético pueden encontrarse varios genes implicados en la resistencia a diferentes familias de antimicrobianos, provocando que las bacterias que los poseen presenten un fenotipo de multirresistencia.

Los principales mecanismos que facilitan la transferencia horizontal de genes entre bacterias son:

a) Conjugación. En este proceso el ADN que forma parte de plásmidos y transposones conjugativos puede ser transferido de una célula donadora a una célula receptora por contacto directo a través de los pilis sexuales, siendo el mecanismo más importante ya que es llevado a cabo por un gran número de especies y géneros bacterianos (Davison, 1999).

b) Transducción. Implica la transferencia de material genético de una bacteria a otra por medio de un bacteriófago (Davison, 1999; Orman, 2006).

c) Transformación. Es un proceso que implica la incorporación de ADN libre que puede proceder del medio ambiente por autólisis bacteriana y se incorpora directamente a una bacteria receptora competente llevándose a cabo una recombinación genética (Davison, 1999; Orman, 2006). Cuando una bacteria es capaz de tomar una molécula de ADN y ser transformada se dice que es competente.

Entre los elementos o plataformas genéticas involucradas en la transferencia horizontal de resistencia se encuentran:

1.2.1.1. Plásmidos

Son moléculas de ADN circulares extracromosómicas que pueden codificar resistencia a antimicrobianos. Los plásmidos son autorreplicantes,

independientemente del ADN cromosómico de la bacteria. Los plásmidos se componen de una región constante que contiene los genes responsables de funciones esenciales como la replicación, el mantenimiento y la transferencia, y una región variable donde se localizan los genes responsables de funciones adaptativas (resistencia a antimicrobianos, factores de virulencia o producción de bacteriocinas) (Osborn y col., 2000; Taylor y col., 2004; Wegrzyn, 2005).

La clasificación de los plásmidos se ha realizado en base a diferentes criterios, como el número de copias, el rango de hospedador, el grupo de incompatibilidad y su capacidad de transferencia entre células. Esta última característica permite diferenciar estos elementos en plásmidos conjugativos (transferibles por conjugación) y plásmidos no conjugativos-móviles (transferidos por la acción de un plásmido conjugativo coexistente en la misma bacteria) (Francia y col., 2004; Taylor y col., 2004).

1.2.1.2. Elementos transponibles

Los transposones son secuencias cortas de ADN que tienen la capacidad de cambiar de posición dentro del cromosoma, por lo que también reciben el nombre de elementos genéticos móviles. Los transposones, a diferencia de los plásmidos, no se replican independientemente y deben estar mantenidos dentro un replicón funcional, ya sea plasmídico o cromosómico. Debido a estas estructuras genéticas, los plásmidos de diversos orígenes poseen genes idénticos de resistencia y juegan un papel importante en la evolución y diseminación de la resistencia entre bacterias (French y Phillips, 1997). Una característica a resaltar de los transposones es la posibilidad de que varios de ellos, codificando resistencias a múltiples antimicrobianos, estén incluidos dentro de un mismo plásmido, lo que permite por transferencia de este último la adquisición de multirresistencia por parte de la bacteria receptora (Errecalde, 2004).

Se han definido cuatro clases de transposones en enterobacterias en base a sus diferencias estructurales y su mecanismo de transposición: 1) transposones compuestos o transposones de clase I, 2) transposones de clase II, 3) transposones de la familia TN5090-Tn7 y 4) transposones conjugativos, siendo las tres primeras clases las que se encuentran con mayor frecuencia en *Enterobacteriaceae*. Los transposones de clase I o transposones compuestos consisten en dos copias de una secuencia de inserción (IS) con la misma o distinta orientación, que flanquean un número variable de genes con diferentes funciones, principalmente resistencia a

antimicrobianos o funciones catabólicas, y que contribuyen a la transposición (Berg y Howe, 1989). La movilidad de estos elementos también está relacionada con su asociación a fagos o plásmidos conjugativos, donde estos transposones se encuentran (Osborn y Boltner, 2002; Toussaint y Merlin, 2002). Los ejemplos más representativos de los transposones de clase I en *Enterobacteriaceae* son Tn5 (IS50, *kan*) y Tn1525 (IS15, *kan*), que confieren resistencia a kanamicina, y Tn10 (IS10, *tet*), que confiere resistencia a tetraciclina (Sherburne y col., 2000). Los transposones de clase II, los más prevalentes en enterobacterias, se caracterizan por la presencia de genes que codifican una transposasa y una resolvasa, y un segmento de ADN variable, todo ello flanqueado por dos IR (*inverted repeat*). Dentro de esta clase se han definido dos subgrupos dependiendo de la orientación de la transposasa y la resolvasa: los derivados de Tn3 y los derivados de Tn21 (Liebert y col., 1999; Grindley y col., 2001). Los transposones tipo Tn3 constituyen un grupo ampliamente diseminado en bacterias gramnegativas y grampositivas aisladas de personas, de animales y del medio ambiente. Estos transposones son responsables de la diseminación de diferentes variantes de tipo *bla*_{TEM}. Los transposones de la familia Tn5090-Tn7 engloban el transposon mercurial Tn5090 y los transposones asociados a integrones de clase 1 (Tn402) y de clase 2 (Tn7) descritos en bacterias gramnegativas. Los transposones conjugativos (CTn) engloban elementos genéticos muy diversos que también se conocen como elementos integrativos-conjugativos (ICEs) o elementos conjugativos-autotransmisibles-integrativos (CONSTINs), denominación que hace referencia a su capacidad de autotransferencia e integración en el cromosoma bacteriano y menos frecuentemente en plásmidos (Salyers y col., 1995; Burrus y col., 2002; Mullany y col., 2002). Los CTn han sido implicados en la diseminación de resistencia a antimicrobianos, principalmente tetraciclinas y macrólidos, y se han identificado frecuentemente en microorganismos gramnegativos. El representante más emblemático de este grupo es Tn916 que confiere resistencia a tetraciclina y que fue inicialmente identificado en *Enterococcus faecalis* y posteriormente en *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas* (Rice, 1998).

Las Secuencias de Inserción (IS) que forman parte de los transposones están constituidas por secuencias cortas de ADN que codifican la síntesis de una transposasa responsable de la transposición. Las IS están implicadas en distintos mecanismos de transposición. Actuando como secuencias homólogas repetitivas, estos elementos están implicados en deleciones, inversiones o reorganizaciones del genoma bacteriano que tienen un gran efecto en su ensamblaje y en la agrupación de genes con funciones adaptativas como resistencia a antimicrobianos, virulencia o

funciones catabólicas (Mahillon y col., 1999; Bennett, 2004). Además se han relacionado con eventos de movilización de genes y transposones como Tn21 y con la expresión de genes de resistencia que incluyen genes *bla*_{CTX-M} y *bla*_{SHV} entre otros (Partridge y Hall, 2003; Ford y Avison, 2004; Eckert y col., 2006).

1.2.1.3. Integrones y casetes genéticos

Los integrones son elementos genéticos que incluyen un sitio específico de recombinación capaz de capturar y movilizar genes contenidos en elementos móviles denominados casetes. Estas estructuras son moléculas de ADN no replicativas y circulares que contienen un gen carente de promotor (típicamente de resistencia a antimicrobianos o desinfectantes) y un sitio específico de recombinación denominado *attC* o elemento de 59 pb ubicado en el extremo 3' de la secuencia e implicado en su movimiento (Hall y Collis, 1995; Recchia y Hall, 1995a; Labbate y col., 2009). Los casetes se diferencian de los transposones en que no codifican la enzima responsable de su movimiento (Hall, 1997) y pueden diseminarse a través de las poblaciones bacterianas por mecanismos de transferencia horizontal (Collis y Hall, 1992). Los integrones no están dotados de movilidad sino que se asocian a secuencias de inserción, transposones y/o plásmidos conjugativos que permiten su transmisión intra e intercelularmente (Sundstrom y col., 1991; Liebert y col., 1999; Mazel, 2006).

Los integrones se componen de una región 5' conservada, una región variable y una región 3' conservada. La región 5' CS (5'-*conserved region*) está conformada por un gen *intI* que codifica para una integrasa de la familia de las tirosina-recombinasas, seguido de un sitio primario de recombinación (*attI*) involucrado en la integración y escisión de los casetes genéticos, y un promotor (Pc) ubicado hacia el extremo 3' de la integrasa que asegura la expresión de estos genes. Esta secuencia promotora es seguida en ocasiones de un segundo promotor (P2) localizado adyacentemente al extremo 3' del primero.

Se han identificado cinco clases de integrones asociados a la diseminación de genes de resistencia en *Enterobacteriaceae* que difieren entre sí en las secuencias de sus integrasas (Rowe-Magnus y Mazel, 2002):

1.2.1.3.1. Integrones de clase 1 (*intI1*)

Los integrones de clase 1 son derivados del transposón Tn402 y son asociados frecuentemente a distintos transposones de la familia Tn3 (Tn21, Tn1, Tn3) (Fluit y Schmitz, 2004; Mazel, 2006). Estos elementos presentan dos regiones conservadas (5'CS y 3'CS) y una región variable donde se localizan los genes de resistencia que han sido incorporados (figura 1). Como se mencionó anteriormente, en el extremo 5' CS se encuentra el gen (*intI1*) seguido del sitio de recombinación específico *attI1*. La región variable se encuentra entre las dos regiones conservadas. Una gran variedad de genes casetes ha sido descrita dentro de esta región. Su localización y su número dentro de los integrones es muy variable debido a deleciones, reorganizaciones e inserciones (Rowe-Magnus y Mazel, 2002; Fluit y Schmitz, 2004). La región 3'CS (3'-conserved region) está constituida por un gen de resistencia a compuestos de amonio cuaternario (*qacEΔ1*), un gen de resistencia a sulfamidas (*sul1*) y una secuencia o marco de lectura abierto de función desconocida (*orf5*) (Fluit y Schmitz, 2004).

Por otra parte se han identificado los llamados integrones defectivos o no clásicos que conservan la estructura de la región 5' CS pero que modifican su región 3' CS, en la que se encuentra el gen *sul3* (Antunes y col., 2007).

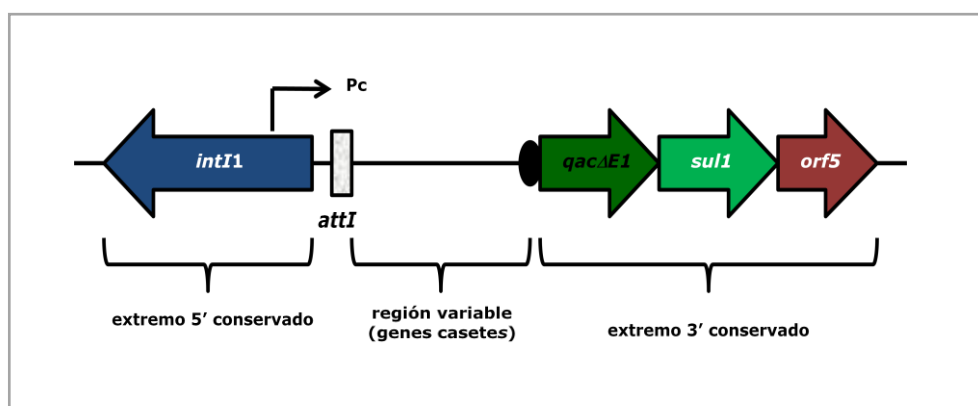


Figura 1.1. Representación esquemática de un integrón de clase 1 (*intI1*)

1.2.1.3.2. Integrones de clase 2 (*intI2*)

Los integrones de clase 2 están relacionados exclusivamente con la familia Tn7 (Sundstrom y col., 1991; Radstrom y col., 1994) y poseen escasa capacidad de recombinación debido a la presencia de un codón de terminación ubicado en el aminoácido 179 de la integrasa. Presentan una región conservada 5' en la que se encuentra el gen que codifica la integrasa (*intI2*) y el sitio de recombinación

específico *attI2*. La región conservada 3' está conformada por los genes *tns E, D, C, B* y *A* que codifican las proteínas necesarias para su transposición (Orman, 2006).

1.2.1.3.3. Integrones de clase 3 (*intI3*)

Los integrones de clase 3 son similares a los de clase 1 y están asociados a transposones en plásmidos conjugativos (Collis y col., 2002; Correia y col., 2003) y su frecuencia de detección es baja.

1.2.1.3.4. Integrones de clase 4 y de clase 5

Los integrones de clase 4 también llamados integrones *Vhc*, identificados en *Vibrio cholerae*, son super-integrone cromosomales caracterizados por presentar múltiples genes casetes de diferentes funciones incorporados en tándem (Hopkins y col., 2006; Mazel, 2006). Los integrones de clase 5 se han identificado en un transposón compuesto localizado en un plásmido de *Vibrio salmonicida* (Mazel y col., 2006).

Los integrones más frecuentes son los de clase 1 y están localizados en transposones y plásmidos y diseminados ampliamente entre las especies de la familia *Enterobacteriaceae* (Martinez-Freijo y col., 1999; Leverstein-Van Hall y col., 2002; Leverstein-van Hall y col., 2003; Fluit y Schmitz, 2004; Antunes y col., 2006).

La variabilidad de los genes casetes que componen los integrones (implicados en la resistencia a antimicrobianos, virulencia o funciones metabólicas) y de las estructuras donde se localizan indica que estos elementos, que parecen haber tenido origen en los superintegrone, contribuyen a la flexibilidad del genoma y a la capacidad de adaptación (Fluit y Schmitz, 1999; Rowe-Magnus y Mazel, 2002; Fluit y Schmitz, 2004; Mazel, 2006).

1.3. MECANISMOS DE ACCIÓN Y DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

En este apartado se revisan los mecanismos de acción y de resistencia a los antimicrobianos incluidos en este estudio.

1.3.1. Tetraciclinas

Las tetraciclinas son antimicrobianos de amplio espectro que actúan como agentes bacteriostáticos inhibiendo la síntesis de proteínas en las células bacterianas. Dicha inhibición la llevan a cabo evitando la unión del aminoacil-ARN de transferencia (ARNt) al sitio A del ribosoma, uniéndose las tetraciclinas específicamente a la subunidad 30S del ribosoma de la bacteria durante la fase inicial de la síntesis de proteínas (Goldman y col., 1983; Canton y col., 1999; Chopra y Roberts, 2001). Para que la tetraciclina se una al ribosoma bacteriano y ejerza su acción debe atravesar la membrana externa y citoplasmática de los microorganismos gramnegativos como *E. coli*. Aparentemente, la membrana externa se atraviesa a través de las porinas OmpF y OmpC mediante difusión pasiva y por un proceso de energía dependiente de la membrana citoplasmática (Chopra y Roberts, 2001;) y, más tarde, el compuesto químico se disocia, permitiendo así que la fracción lipofílica atravesase la membrana citoplasmática. La unión del compuesto al ribosoma es reversible, lo que explica el efecto bacteriostático de estos antimicrobianos.

Esta clase de antimicrobianos ha sido ampliamente usada, y después de su introducción en la agricultura y para uso veterinario las resistencias adquiridas frente a estos antimicrobianos aumentaron considerablemente en muchas bacterias. Uno de los problemas ha sido el uso de tetraciclinas como promotores de crecimiento adicionadas en el alimento, lo que sin duda ha ejercido una permanente presión de selección sobre la microbiota bacteriana, y ha supuesto un riesgo muy importante para el incremento de bacterias patógenas en humanos resistentes a estos antimicrobianos (Chopra y Roberts, 2001; Jara, 2007).

La base de esta resistencia está relacionada con la alteración del sistema de transporte activo de la tetraciclina hacia el citoplasma y el bombeo del antimicrobiano hacia el exterior. La protección del ribosoma a través de una proteína citoplasmática que bloquea la unión del antimicrobiano a la subunidad 30S del ribosoma es frecuente, y también se ha descrito en algunas bacterias la existencia de actividades enzimáticas que degradan el antimicrobiano. El mecanismo de resistencia mejor estudiado es la expulsión activa de las tetraciclinas. Los genes *tet* codifican una proteína de membrana citoplasmática (Tet) que actúa como un transportador activo; esta proteína intercambia un protón por un complejo tetraciclina catión (Canton y col., 1999). El proceso de resistencia está regulado por dos genes, uno codifica una bomba de expulsión activa y el otro una proteína represora; la actividad de estos genes está regulada por la presencia o

ausencia de tetraciclinas (Chopra y Roberts, 2001). Actualmente se conocen al menos 12 mecanismos distintos de resistencia, siendo frecuente que muchos de ellos estén codificados por genes localizados en plásmidos y transposones, lo que facilita su diseminación entre diferentes especies bacterianas (Lemos, 2003).

Los determinantes de resistencia a tetraciclinas están extendidos entre las especies bacterianas y se han identificado en unos 32 microorganismos gramnegativos y en 22 grampositivos, encontrándose con frecuencia en bacterias multirresistentes (Roberts, 1996; Levy y col., 1999). La resistencia se debe a menudo a la adquisición de nuevos genes *tet* asociados con plásmidos conjugativos o transposones (Roberts, 1996).

Se han descrito un total de 39 genes *tet* que codifican diferentes mecanismos de resistencia, de los cuales 24 codifican proteínas Tet asociadas a la membrana dependientes de energía que expulsan las tetraciclinas fuera de la célula, disminuyendo la concentración intracelular de la droga y protegiendo de esta manera los ribosomas. Otros 11 de estos genes *tet* codifican proteínas que protegen el blanco de acción en el ribosoma (Chopra y Roberts, 2001; Roberts, 2005) y tres más producen enzimas inactivadoras del antimicrobiano. Los genes que codifican para proteínas involucradas en la resistencia a tetraciclinas asociados con un mecanismo de bomba de flujo son: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(I)*, *tet(J)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(Y)*, *tet(30)*, *tet(31)*, *tet(35)* y *tet(39)* en las bacterias gramnegativas, siendo los dos primeros los determinantes de resistencia a tetraciclinas más ampliamente distribuidos en enterobacterias (Roberts, 1996), y *tet(K)*, *tet(L)*, *tetA(P)*, *tet(V)*, *tet(Z)*, *tet(33)*, *tet(38)*, *tcr3*, *otr(B)* y *otr(C)* en las bacterias grampositivas (Roberts, 2005). Los genes que codifican este mecanismo en las bacterias gramnegativas están ampliamente distribuidos y generalmente están asociados con plásmidos que pertenecen a diferentes grupos de incompatibilidad (Mendez y col., 1980; Jones y col., 1992; Roberts, 1996). Estos genes frecuentemente son parte de transposones capaces de cambiar su localización dentro de la célula y adquirir una movilidad aumentada insertándose en un plásmido conjugativo.

Los genes que codifican resistencia a tetraciclinas asociados con un mecanismo de protección ribosomal y que generalmente están asociados con transposones conjugativos con preferencia por el cromosoma (Roberts, 1997) son: *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(Q)*, *tetB(P)*, *tet(T)*, *tet(W)*, *otr(A)*, *tet*, *tet(32)* (identificado en *Clostridium sp.*) y *tet(36)* (identificado en *Bacteroides sp.*), siendo los más estudiados los genes *tet(M)* y *tet(O)* (Burdett, 1991; Taylor y Chau, 1996) que son

más comunes en bacterias grampositivas, aunque también han sido descritos en gramnegativas. Las proteínas codificadas por estos genes se unen a la subunidad 50S, un sitio diferente al de unión de la tetraciclina, pero el cambio conformacional del ribosoma que se produce tras su unión es suficiente para evitar la unión de la tetraciclina (Connell y col., 2003).

Los tres genes de resistencia que causan la alteración enzimática de las tetraciclinas son *tet(X)*, encontrado en dos transposones de *Bacteroides*, *tet(34)*, presente en un *Vibrio*, y *tet(37)*, presente en la microbiota oral del hombre (Roberts, 1996; Chopra y Roberts, 2001; Fluit y col., 2001; Mascaretti, 2003; Roberts, 2005).

Por último, el gen *tet(U)*, localizado en un plásmido de *Enterococcus faecium*, codifica la proteína TetU que es más pequeña que las proteínas responsables de los mecanismos de bomba de flujo y de protección ribosomal, confiere resistencia a bajos niveles de tetraciclinas y su mecanismo de resistencia se desconoce (Chopra y Roberts, 2001; Roberts, 2005).

Son escasos los estudios que han examinado los determinantes de resistencia a las tetraciclinas en bacterias aisladas de una gran variedad de especies animales, con diferentes historias de exposición a estos antimicrobianos, o en muestras medioambientales (Bryan y col., 2004).

1.3.2. β -lactámicos

La presencia de un anillo betalactámico define químicamente a la familia de los antimicrobianos betalactámicos. Este anillo contiene modificaciones que caracterizan las propiedades de los diferentes grupos que se han definido dentro de esta familia: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactámicos e inhibidores de las betalactamasas. El grupo de los antimicrobianos betalactámicos es uno de los mejor conocidos y ampliamente utilizados tanto en medicina humana como en veterinaria debido a su actividad bactericida, alta eficacia, escasa toxicidad y amplio margen terapéutico (García y col., 1999). Dentro de este grupo, el uso de las penicilinas en conejos está permitido desde mediados de los años cincuenta.

Los betalactámicos actúan sobre el peptidoglicano de la pared celular bacteriana inhibiendo la última etapa de su síntesis e induciendo su destrucción. Esta actividad es ejercida mediante su unión irreversible a las enzimas encargadas del último paso en la síntesis del peptidoglicano, las proteínas fijadoras de penicilinas o PBPs

(*Penicillin Binding Proteins*), que son proteínas asociadas con la membrana celular bacteriana que se unen a la penicilina y, por tanto, son sitios diana para estos antimicrobianos. La acción de los betalactámicos no es posible si la bacteria no se multiplica (momento en que se sintetiza la pared celular); por ello, para poder actuar necesitan que estos microorganismos estén en fase de crecimiento exponencial o logarítmico. Los betalactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que degrada o destruye el peptidoglicano. Esta última acción es la responsable del efecto bactericida de estos antimicrobianos, sin embargo, sobre las bacterias que carecen de estas autolisinas los betalactámicos sólo ejercen un efecto bacteriostático (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

La resistencia desarrollada por las bacterias frente a estos antimicrobianos puede deberse a varios mecanismos que en algunas ocasiones aparecen asociados, tales como (García y col., 1999; Marin y Gudiol, 2003):

- La disminución de la permeabilidad a los antimicrobianos mediante la pérdida o cambios en los poros proteicos o porinas de la membrana externa de la bacteria como resultado de mutaciones cromosómicas, lo que impide a los betalactámicos acceder a las PBPs. Este mecanismo confiere resistencia innata a los microorganismos gramnegativos a ciertos betalactámicos.
- Modificación de las dianas (PBPs) lo que implica una disminución o pérdida de afinidad de los betalactámicos por estas proteínas, a las que no pueden unirse y aparece la resistencia.
- Inactivación del antimicrobiano mediante la producción de enzimas betalactamasas, enzimas que actúan rompiendo el enlace amídico del anillo betalactámico dando lugar a compuestos sin actividad antibacteriana. El grado de resistencia que determinan se correlaciona con su concentración, afinidad por los diferentes betalactámicos y propiedades hidrolíticas. En bacterias gramnegativas las betalactamasas se concentran usualmente en el espacio periplásmico, con lo que el antimicrobiano se inactiva nada más atravesar la membrana.
- La resistencia por expulsión activa que es debida a que los antimicrobianos no se pueden acumular en las bacterias para ejercer su acción dado que estas poseen en sus envolturas una bomba que los elimina activamente (sistema de eflujo).

El principal mecanismo de resistencia en bacterias gramnegativas como *E. coli* consiste en la producción de betalactamasas codificadas en plásmidos o en el ADN cromosómico (McDermott y col., 2003; Tenover, 2006). Ambler propuso una

clasificación de las betalactamasas basada en la secuencia aminoacídica de la proteína, que es la más utilizada (Ambler, 1980; Ambler y col., 1991) y distingue 4 clases de enzimas: A, B, C y D. Las betalactamasas de clase A, B o C se caracterizan por la presencia del aminoácido serina en el sitio activo; las de clase D requieren la presencia de Zn^{2+} para su actividad (Ambler, 1980). Las enzimas plasmídicas conocidas como betalactamasas de espectro extendido (BLEEs), que derivan de las clásicas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 por una acumulación de cambios aminoacídicos puntuales, son capaces de hidrolizar el anillo betalactámico tanto de las penicilinas (penicilinasas) como de las cefalosporinas (cefalosporinasas) incluyendo las de tercera y cuarta generación pero no el de las cefamicinas o los carbapenemes. Estas enzimas son inhibidas por los inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Las BLEEs suelen denominarse con tres letras, generalmente relacionadas con algún dato de la enzima, y un número que indica el orden dentro de una determinada familia. Así, SHV-1 es la primera betalactamasa plasmídica sulfhídrico (SH) variable (V) (García Sánchez y col., 1999), y la denominación TEM-1 hace referencia a que se identificó por primera vez en una cepa de *E. coli* aislada de un hemocultivo de un paciente llamado Temoniera en Grecia (Bradford, 2001).

Las BLEEs se clasifican en diferentes tipos en función de su secuencia aminoacídica, siendo las enzimas de clase A de las familias TEM, SHV, CTX-M y las enzimas de clase D tipo OXA las más frecuentemente identificadas en *Enterobacteriaceae*, principalmente entre las especies *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. En los últimos años han adquirido gran relevancia un nuevo tipo de BLEEs plasmídicas, las cefotaximasas, también denominadas CTX-M debido a que poseen un mayor poder hidrolítico frente a cefotaxima (Bonnet, 2004). Estas BLEEs no están relacionadas con las de tipo SHV y TEM sino que derivan de las betalactamasas cromosómicas de distintas especies bacterianas medioambientales del género *Kluyvera* (Bonnet, 2004; Lartigue y col., 2004) y actualmente son las más frecuentes en la mayoría de los países. En España, son en la actualidad las BLEEs mayormente detectadas en aislados clínicos a nivel hospitalario, siendo las más frecuentes las del grupo CTX-M-9 (CTX-M-9 y -14) y CTX-M-1 (CTX-M-1, -10, -15 y -32). Estas enzimas son mayoritariamente aisladas de *E. coli* (Hernández y col., 2005; Oliver y col., 2005; Mugnaioli y col., 2006). La familia CTX-M comprende hasta la fecha más de 70 enzimas, que pueden clasificarse por su similitud en las respectivas secuencias aminoacídicas (Bonnet y col., 2004). Filogenéticamente se diferencian cinco grandes grupos de enzimas CTX-M. El grupo CTX-M-1 incluye once enzimas mediadas por plásmidos (CTX-M-1, CTX-M-3,

CTX-M-10, CTX-M-12, CTX-M-15, CTX-M-22, CTX-M-23, CTX-M-28, CTX-M-30, CTX-M-32 y FEC-1) (Gniadkowski y col., 1998; Karim y col., 2001; Kariuki y col., 2001; Oliver y col., 2001) y el grupo CTX-M-2 nueve enzimas CTX-M también mediada por plásmidos (CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-4L, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-20, CTX-M-31 y Toho-1) (Ishii y col., 1995; Bauernfeind y col., 1996; Bradford y col., 1998; Gazouli y col., 1998; Tassios y col., 1999; Saladin y col., 2002). CTX-M-8 constituye un grupo por si misma (Bonnet y col., 2000). El grupo CTX-M-9 incluye diez enzimas mediadas por plásmidos (CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-24, CTX-M-27 y Toho-2) (Labia, 1999; Sabate y col., 2000; Bonnet y col., 2001; Pai y col., 2001; Poirel y col., 2001; Cao y col., 2002; Chanawong y col., 2002; Saladin y col., 2002; Bonnet y col., 2003). La CTX-M-9 es una de las BLEEs más comunes y que se ha encontrado con creciente frecuencia en aislados de *E. coli* desde su primera descripción en 1996 (Sabate y col., 2000; Hernández y col., 2005). Esta BLEE se ha descrito en China, Dinamarca, Francia, Japón, Noruega y Reino Unido en aislados de enterobacterias provenientes de animales sanos y enfermos así como de productos cárnicos, destacando la rápida emergencia de CTX-M (Li y col., 2007). El último grupo de la familia CTX-M corresponde a CTX-M-25, que incluye las enzimas CTX-M-25 y CTX-M-26 (acceso GenBank número AY157676 y AF518567 respectivamente). Con frecuencia se han observado los genes codificantes de CTX-M localizados en plásmidos conjugativos de diferentes tamaños en los que en ocasiones también se han detectado otros genes de betalactamasas como *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-2} y los de tipo *bla*_{SHV} o *bla*_{OXA-1}, o genes que codifican resistencia a antimicrobianos de otras familias como aminoglucósidos, cloranfenicol, sulfamidas, trimetoprim o tetraciclinas (Bonnet, 2004).

Por lo general, cuando se habla de BLEEs se hace referencia únicamente a las enzimas de codificación plasmídica, ya que son estas las que suponen un mayor problema epidemiológico debido a su elevada capacidad de diseminación. El hecho de encontrarse codificadas en plásmidos conjugativos permite la diseminación de este mecanismo de resistencia no solo entre distintos aislados de la misma especie sino también entre distintas especies bacterianas. Las BLEEs también forman parte de transposones o integrones lo cual determina su asociación con otros determinantes genéticos de resistencia transferible, como los que confieren resistencia a los aminoglucósidos (Canton y col., 2002). No es infrecuente la producción de más de un tipo de BLEE por un determinado microorganismo (Jeong y col., 2004; Romero y col., 2005).

Las betalactamasas encontradas con mayor frecuencia en aislados de *E. coli* procedentes tanto de animales como de personas son las de tipo TEM, que es una familia de betalactamasas codificadas en plásmidos de la que derivan gran cantidad de betalactamasas de espectro extendido (Briñas y col., 2002). SHV es otra familia de betalactamasas también frecuente en aislados de *E. coli* resistentes a ampicilina, que en su mayoría presentan el fenotipo de BLEEs (Bradford, 2001). Como en el caso de los genes *bla*_{TEM}, la diseminación de los genes *bla*_{SHV} está facilitada por su asociación con plásmidos conjugativos que contienen frecuentemente otros determinantes de resistencia (Heritage y col., 1999). Ambas familias de betalactamasas presentan un espectro de actividad variable frente a cefotaxima o ceftazidima debido a la presencia de algunas mutaciones específicas (Bradford, 2001). Otra familia conocida son las betalactamasas tipo CMY, que son β -lactamasas plasmídicas de clase C que a diferencia de las anteriores no son consideradas de espectro extendido. Dentro de esta familia, CMY-2 es la más frecuente en aislados de *E. coli* de origen animal y humano (Alvarez y col., 2004; Li y col., 2007). Las betalactamasas de tipo OXA tienen el fenotipo de betalactamasas de espectro extendido (Bradford 2001), son clasificadas como β -lactamasas clase D con marcada habilidad para hidrolizar penicilinas como oxacilina, cloxacilina y benzilpenicilina (Thomson y Smith Moland, 2000) y han sido detectadas principalmente en aislados de *Pseudomona aeruginosa* (Hall y col., 1993; Philippon y col., 1997; Danel y col., 1999; Bradford, 2001; Poirel y col., 2001) aunque también se han detectado con escasa frecuencia en enterobacterias (Zhang y col., 2009). Por otro lado, todas las cepas de *E. coli* presentan el gen de la betalactamasa cromosómica AmpC, perteneciente a la clase C, pero solo en algunas ocasiones se hiperproducen confiriendo resistencia a β -lactámicos (Philippon y col., 2002).

Los genes frecuentemente asociados a *bla* confieren resistencia a diferentes familias de antimicrobianos: *aad* (aminoglucósidos), *dfr* (trimetoprim), *cml* o *cat* (cloranfenicol), *qac* (compuestos de amonio cuaternario) *bla*_{OXA} (β -lactámicos), *tet* (tetraciclinas) y *sul* (sulfamidas). Algunos de estos determinantes se encuentran asociados a integrones que poseen genes *bla*_{BLEE} específicos como *bla*_{CTX-M-9} (Novais, 2010).

1.3.3. Aminoglucósidos

El mecanismo de acción de los aminoglucósidos está regido por su unión irreversible a la unidad 30S del ribosoma bacteriano lo que inhibe la síntesis

proteica y conduce finalmente a la muerte del microorganismo (Shakil y col., 2008). Estos antimicrobianos son clasificados como bactericidas activos relacionados con la dosis frente a un amplio número de microorganismos (Durante-Mangoni y col., 2009).

Los mecanismos de resistencia incluyen la disminución intracelular del aminoglucósido, causada por alteraciones a nivel de la membrana externa que dificultan la entrada de la droga a la bacteria o por bombas que expulsan el antimicrobiano al exterior, la alteración del sitio de unión al ribosoma, debido a mutaciones en los genes que codifican los sitios de unión a estas drogas, siendo este un mecanismo que sólo causa resistencia importante a estreptomicina, la metilación del sitio de unión de los aminoglucósidos en el ribosoma (sitio A del ARNr 16S) y, por último, el mecanismo más importante basado en la modificación enzimática de los aminoglucósidos (Mingeot-Leclercq y col., 1999). Este último mecanismo consiste en una alteración química del antimicrobiano que conlleva una disminución de su afinidad por los ribosomas y que puede ser de tres tipos: acetilación del grupo amino por una N-acetiltransferasa tipo II (AAC), adenilación del grupo hidroxilo por una O-adeniltransferasa (ANT) y fosforilación del grupo hidroxilo por una O-fosfotransferasa (APH) (Shaw y col., 1993; Wright, 1999; Smith y Baker, 2002). Entre los genes que se han descrito en bacterias gramnegativas se señalan *aac(3)-IIa*, *aac(3)-IVa* y *ant(2)''-Ia* (Shaw y col., 1993). El gen *aac(3)-IIa* confiere resistencia a gentamicina, tobramicina, dibekacina, netilmicina y sisomicina (Shimizu y col., 1985), el gen *aac(3)-IVa* además de conferir resistencia a estos mismos antimicrobianos, también lo hace a la apramicina (Allmansberger y col., 1985) y el gen *ant(2)''-Ia* confiere resistencia a gentamicina, tobramicina, dibekacina, sisomicina y kanamicina (Cameron y col., 1986). En algunos casos se ha utilizado otra nomenclatura como es el caso de *strA* y *strB* que codifican dos fosfotransferasas y *aadA*, gen que codifica para una adeniltransferasa que confiere resistencia a estreptomicina (Hollingshead y Vapnek, 1985; Shaw y col., 1993). Los genes que codifican estas enzimas forman parte con frecuencia de integrones y transposones movilizables por plásmidos.

1.3.4. Macrólidos

Los macrólidos son agentes bacteriostáticos que actúan inhibiendo la síntesis proteica de los microorganismos sensibles al unirse reversiblemente a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. Las diferencias en el mecanismo de acción se explican por la existencia de distintos sitios de fijación: los fármacos del grupo de la

eritromicina se unen a la proteína L₂₂, mientras que los del grupo de la espiramicina lo hacen a la proteína L₂₇. Ambas proteínas forman parte de la subunidad 50S ribosomal. Estos antimicrobianos, considerados primariamente bacteriostáticos, también pueden comportarse como bactericidas dependiendo del microorganismo, de las concentraciones del antimicrobiano y del tiempo de exposición. Su efecto bactericida puede estar en relación con alteraciones de la pared celular provocadas por la disregulación de la síntesis proteica o la acumulación tóxica de aminoacil-ARN_t que induce la activación de autolisinas. Todos los fármacos de esta familia producen un efecto post-antimicrobiano prolongado (Escolar Jurado y col., 1998). La mayoría de los bacilos gramnegativos, entre ellos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, son resistentes a las dosis terapéuticas probablemente debido a una impermeabilidad de la membrana externa de la pared celular al paso de los macrólidos (Sabath y col., 1968; Escolar Jurado y col., 1998).

Los mecanismos involucrados en la resistencia antimicrobiana a macrólidos se encuentran principalmente en bacterias grampositivas, aunque también se detectan en gramnegativas, y la mayoría están codificados en elementos móviles lo que facilita su diseminación. Estos mecanismos se pueden clasificar en tres tipos: modificación de la diana, bombas de expulsión e inactivación enzimática (Leclercq y Courvalin, 1993; Weisblum, 1995). La modificación de la diana puede consistir en la metilación de la adenina debido a una metilasa codificada por genes denominados *erm* (*erythromycin ribosome methylation*), de los cuales se han descrito al menos 21 clases (Roberts y col., 1999), lo que reduce la fijación del antimicrobiano a la subunidad ribosómica. Asimismo, la modificación de la diana puede ocurrir, aunque de manera menos frecuente, por alteraciones en la proteína L4 o en la secuencia del ARNr 23S (Weisblum, 1995). En cuanto a las bombas de expulsión activa se han descrito diversos tipos que difieren principalmente en el sustrato. Así, por ejemplo, los genes *mef* y *erpA* están involucrados en la expulsión activa de macrólidos de 14 ó 15 átomos de carbono y los genes *msr* de macrólidos de 14 átomos de carbono. El último mecanismo conocido es la inactivación enzimática producida a través de esterazas (*ere*) o fosfotransferasas (*mph*) bacterianas, que a diferencia del anterior mecanismo transforma el macrólido en una sustancia bacteriológicamente inactiva al hidrolizar su anillo lactónico (Escolar-Jurado y col., 1998).

1.3.5. Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas o quinolonas fluoradas son fármacos sintéticos con propiedades antimicrobianas que actúan como inhibidores de los ácidos nucleicos y

entre los que se encuentran las antiguas 4-quinolonas, las fluoroquinolonas, la novobiocina, las rifampicinas, los nitrofuranos y los nitroimidazoles. La actividad antimicrobiana es amplia e incluye bacterias aerobias gramnegativas y algunas grampositivas. Las fluoroquinolonas son ampliamente utilizadas en caninos, felinos, bovinos, equinos, porcinos y aves (Lees y Shojaee Aliabadi, 2003).

En el caso particular de la enrofloxacin, fluoroquinolona ampliamente utilizada en ciertas especies animales como antimicrobiano de amplio espectro, su mecanismo de acción consiste básicamente en inhibir las funciones de la ADN girasa, involucrada en el proceso de replicación, recombinación y reparación del ADN de la bacteria (Gobernado y col., 1999). Las fluoroquinolonas son bactericidas que actúan siguiendo una cinética de muerte bacteriana que depende de la relación dosis-tiempo de administración. Estos antimicrobianos penetran en la célula bacteriana de forma rápida a través de porinas; subsecuentemente atraviesan la membrana citoplasmática, proceso que se ve facilitado por la alta liposolubilidad de estas moléculas (Lees y Shojaee, 2003). Una vez dentro de la célula bacteriana inhiben el proceso de transcripción por uniones no covalentes a los complejos ADN-girasa. Este mecanismo de acción hace que a las fluoroquinolonas también se les denomine inhibidores de la girasa. La principal girasa bacteriana estudiada fundamentalmente en *E. coli* es una topoisomerasa II, codificada por los genes *gyrA* y *gyrB*. Las topoisomerasas son enzimas celulares que se encargan de regular el número de vueltas con que cada una de las cadenas de la doble hélice del ADN se trenza con su homóloga y catalizan el corte de una de las bandas de la doble hélice alterando la configuración del ADN, transformando la energía química del ATP en mecánica, lo que permite un enrollamiento adicional, variando el número de giros secundarios al romper una o ambas cadenas. La topoisomerasa II actúa sobre cadenas dobles de ADN. Las fluoroquinolonas, al unirse a las subunidades de la girasa en el complejo ADN-girasa por la gran afinidad que tienen por el ADN, impiden la rotura y sobre todo el sellado de la cadena de ADN de doble hélice, estabilizándola y evitando que la enzima se regenere e intervenga en nuevos ciclos y en la formación de giros adicionales, con lo que el ADN, demasiado expandido, no tiene suficiente espacio dentro de la bacteria. La inhibición de la girasa, y la liberación de exonucleasas, explicarían la muerte bacteriana (Gobernado y col., 1999).

Adicionalmente a los mecanismos expuestos, la bacteria responde a la inhibición de la ADN-girasa con una autoprotección hacia la replicación del ADN atacado por medio de una respuesta de cascada de proteínas, lo que se denomina SOS-RecA (*Save Our Souls*), deteniendo la división celular y protegiendo su

supervivencia, fenómeno que se puede medir por el aumento de la producción de β -galactosidasa, lo que explicaría las formas filamentosas que adquieren las bacterias gramnegativas después de haber estado en contacto con las quinolonas. El sistema RecA se activa por una exonucleasa con síntesis de proteínas líticas letales (Gobernado y col., 1999).

En resumen, las fluoroquinolonas actúan en cuatro etapas: paso a través de las porinas de la pared bacteriana y de la membrana citoplasmática hasta llegar al citoplasma, inhibición de la enzima ADN-girasa en bacterias gramnegativas y de la topoisomerasa IV en bacterias grampositivas (ambas son enzimas tipo II esenciales para la replicación y transcripción del ADN), inhibición de la síntesis de ADN proteica e inducción de la respuesta SOS y de autolisinas, lo que conduce a la formación de bacterias filamentosas en el caso de los gramnegativos, y al rápido efecto bactericida comentado anteriormente (Gobernado y col., 1999).

La resistencia a las fluoroquinolonas se produce principalmente debido a la alteración de las dianas, es decir, de la ADN girasa o de la topoisomerasa IV. Este tipo de resistencia es principalmente debida a mutaciones cromosómicas en la región QRDR (Región Determinante de Resistencia a Quinolonas) del gen *gyrA* y en la región homóloga del gen *parC* (genes que codifican para la subunidad A de la ADN-girasa y la topoisomerasa IV, respectivamente). Por otra parte, los genes *gyrB* y *parE* (genes que codifican para la subunidad B de la ADN-girasa y la topoisomerasa IV, respectivamente), tienen una menor contribución en la resistencia a quinolonas (Webber y Piddock, 2001). Otros mecanismos de resistencia conocidos son la disminución de la permeabilidad de la membrana por mutaciones que afectan a las porinas, la expulsión del antimicrobiano mediante bombas de expulsión activa que es un mecanismo mediado por un gen denominado *qepA* (Perichon y col., 2007; Yamane y col., 2007; Martinez-Martinez y col., 2008), la resistencia mediada por el gen *aac(6')/b-cr* que codifica una aminoglucósido acetiltransferasa y la denominada resistencia mediada por plásmidos a través del gen *qnr* perteneciente a la familia de los pentapéptidos repetidos y que protege la girasa bacteriana de la actividad inhibitoria de las quinolonas (Tran y Jacoby, 2002; Hopkins y col., 2005; Nordmann y Poirel, 2005).

Se han descrito numerosas sustituciones aminoacídicas en las subunidades *gyrA/gyrB* y *parC/parE* implicadas en la resistencia a fluoroquinolonas que se localizan predominantemente en la región QRDR. Estos cambios en los aminoácidos suponen una alteración de la estructura del sitio QRDR al que se unen las quinolonas en el complejo topoisomerasa-ADN, lo que da lugar a una disminución

de la afinidad de las quinolonas por el complejo enzima-ADN que conlleva la resistencia a estos antimicrobianos. (Willmott y Maxwell, 1993). Entre las diferentes sustituciones detectadas en *gyrA* de aislados de *E. coli*, los cambios en la posición Ser83 son los más frecuentemente descritos y se caracterizan por producir la resistencia a ácido nalidíxico (Komp Lindgren y col., 2003; Ruiz, 2003). La segunda posición comúnmente descrita en *gyrA* corresponde a Asp87, mutación adicional requerida para obtener mayores niveles de resistencia a fluoroquinolonas en *E. coli* (Komp Lindgren y col., 2003; Ruiz, 2003). Las mutaciones descritas en el gen *parC* de *E. coli* afectan principalmente a los codones 80 y 84, equivalentes a los aminoácidos 83 y 87 de *gyrA* (Ruiz, 2003; Komp y col., 2003).

1.3.6. Antimicrobianos polipeptídicos

Desde el punto de vista de la estructura química, las polimixinas son decapeptidos cíclicos catiónicos unidos a un ácido graso. Aunque existen 5 tipos de polimixinas (A a E) sólo la polimixina B y la E o colistina están disponibles para la práctica clínica. La única diferencia estructural entre la polimixina B y la colistina radica en la porción peptídica, que difiere en un único aminoácido (D-leucina en la colistina o D-fenilalanina en la polimixina B) (Molina y col., 2009). Las polimixinas actúan como detergentes catiónicos y, así, la parte peptídica cargada positivamente se une a la superficie de la membrana externa y la parte lipofílica se une a los fosfolípidos de la membrana desorganizándola y aumentando su permeabilidad, produciéndose como consecuencia la pérdida de electrolitos esenciales y la consiguiente muerte celular. Estos antimicrobianos son, por lo tanto, compuestos bactericidas de acción rápida (Calvo y Martínez-Martínez, 2009). El espectro de actividad se restringe a bacilos gramnegativos aerobios como *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella* y *Pseudomonas aeruginosa* (Kwa y col. 2008).

Debido al desarrollo de antimicrobianos de amplio espectro más seguros fueron pronto reemplazados y en la actualidad se utilizan únicamente como alternativa para el tratamiento de infecciones por bacilos gramnegativos multirresistentes que conservan la susceptibilidad a estos antimicrobianos (Falagas y col., 2005).

La resistencia a polimixinas puede ser intrínseca o adquirida. La primera es independiente de la exposición previa a polimixinas y se debe a la posesión de alguna alteración en la composición del lipopolisacárido que disminuye la afinidad del antimicrobiano por éste (Sidorchuk y col., 1983; Cox y Wilkinson, 1991). La resistencia adquirida es poco frecuente aunque se ha observado en algunas

especies, como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* o *Klebsiella pneumoniae*, en las que se producen alteraciones en los lipopolisacáridos de la membrana que originan una reducción de la afinidad o cambios en la carga, lo que provoca una disminución de los sitios de unión de las polimixinas (Landman y col., 2008).

2 – Hipótesis y Objetivos

“El experimentador que no sabe lo que está buscando no comprenderá lo que encuentra”

Claude Bernard

Las resistencias a los antimicrobianos constituyen actualmente un problema de gran impacto en Salud Pública (Gérvás, 2000). El uso de antimicrobianos se considera el factor más importante que promueve la emergencia, selección y diseminación de microorganismos resistentes a antimicrobianos tanto en medicina veterinaria como en medicina humana. Los tratamientos antimicrobianos inadecuados, tanto por la administración de dosis en intervalos inapropiados como por el uso durante un tiempo insuficiente, han contribuido significativamente al aumento de las resistencias bacterianas con el subsecuente fracaso terapéutico. El uso de antimicrobianos no solo contribuye a la selección de resistencias en bacterias patógenas sino también en bacterias de la microbiota endógena de personas y animales expuestos (van den Bogaard y col., 2001).

La problemática de las resistencias antimicrobianas en medicina humana se ha derivado en múltiples ocasiones hacia el mundo veterinario, postulándose la posible transmisión de los animales al hombre de microorganismos resistentes a través del consumo de carnes contaminadas con contenido intestinal (Aarestrup y Wegener, 1999), o por la transferencia de estos microorganismos desde el animal al hombre por otras vías (Nijsten y col., 1994; van den Bogaard y col., 2001; Soulsby, 2007).

Lo cierto es que en medicina veterinaria se han empleado antimicrobianos de forma profiláctica y como promotores del crecimiento durante años, y aunque la posible conexión entre el uso de antimicrobianos en la producción animal y la medicina veterinaria y la aparición de resistencias en microorganismos humanos no se ha estudiado suficientemente y en ocasiones puede haberse subestimado, organismos como la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2000) han recomendado el cese de la administración de antimicrobianos con fines profilácticos y productivos para intentar disminuir, en la medida de lo posible, la diseminación de resistencias desde los microorganismos de los animales de abasto hacia los del ser humano. Ciertos estudios han constatado una disminución de las resistencias en poblaciones bacterianas animales al abolirse la administración de antimicrobianos como promotores del crecimiento (Aarestrup y col., 2001).

La evaluación del riesgo de desarrollo de resistencias cobra especial interés cuando se utilizan pautas de administración por vía oral en animales de abasto, por cuanto implica el contacto directo del antimicrobiano con bacterias que forman parte de la microbiota intestinal como *Escherichia coli* o *Enterococcus faecium*, especies bacterianas con gran capacidad de adquisición y diseminación de genes de resistencia (Witte, 2000). Hay que tener en cuenta además que el intestino puede ser un hábitat adecuado para el posible intercambio de material genético y, por lo tanto, de resistencias entre bacterias de igual o diferente especie (Scott, 2002). Por

todo ello, la posibilidad de que en el tracto intestinal se seleccionen aislados resistentes a diferentes antimicrobianos cuando los animales son tratados por vía oral es elevada, convirtiéndose las bacterias comensales en posibles reservorios de genes de resistencia que eventualmente pueden ser transferidos a otras bacterias patógenas que forman parte de la microbiota intestinal.

En este contexto, y teniendo también en cuenta la normativa cada vez más exigente de las autoridades reguladoras a la hora de autorizar el uso de antimicrobianos con un enfoque racional, se considera de gran interés la realización de ensayos *in vivo* que permitan evaluar el efecto de la administración de antimicrobianos por vía oral en los animales sobre la emergencia y/o selección de microorganismo resistentes. Así, este estudio se enmarca dentro de un proyecto más amplio realizado en colaboración con el CReSA en el que se pretendió analizar mediante ensayos *in vivo* en tres especies de abasto (cerdos, aves y conejos) el riesgo de aparición de resistencias en bacterias de la microbiota intestinal tras la administración del antimicrobiano correspondiente (enrofloxacin en pollos, colistina en cerdos y doxiciclina en conejos) a diferentes dosis-tiempo de tratamiento. En este proyecto se eligió como prototipo de bacteria gramnegativa *Escherichia coli* y como prototipo de grampositiva *Enterococcus faecium*.

En resumen, en este trabajo se planteó un ensayo experimental *in vivo* en conejos para evaluar el efecto de la administración por vía oral con diferentes pautas de doxiciclina sobre la aparición y/o selección de aislados de *E. coli* resistentes frente a diferentes antimicrobianos. A continuación se exponen la hipótesis de partida y los objetivos planteados para contrastarla.

La **hipótesis de trabajo** consistió en que la combinación dosis-duración del tratamiento con doxiciclina por vía oral tiene influencia sobre el desarrollo y/o selección de bacterias resistentes en la microbiota intestinal.

El **objetivo general** de este trabajo fue evaluar el riesgo de desarrollo o selección de aislados de *Escherichia coli* resistentes en conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de doxiciclina.

Para alcanzar el objetivo general de este trabajo se abordaron los siguientes **objetivos específicos:**

- Estudiar el efecto de la administración oral de doxiciclina sobre los patrones de sensibilidad frente al antimicrobiano empleado en el tratamiento y frente a representantes tipo de diferentes familias de antimicrobianos (doxiciclina, amoxicilina, gentamicina, eritromicina, y enrofloxacin), comparando dichos patrones antes de iniciar el tratamiento, luego de finalizado y cuatro semanas después de la administración.
- Detectar los genes implicados en los mecanismos de resistencia más frecuentes frente a los antimicrobianos considerados en este estudio.
- Investigar la posible relación clonal entre los aislados de *E. coli* de los animales estudiados en las diferentes etapas del ensayo experimental empleando los perfiles REP-PCR, los perfiles de resistencia y los grupos filogenéticos, con el fin de intentar establecer la difusión y persistencia de los aislados resistentes.
- Evaluar el papel de los integrones en la diseminación de genes de resistencia a antimicrobianos en aislados de *E. coli*.

3 – Material y Métodos

"Si no conozco una cosa, la investigaré"

Louis Pasteur

3.1. ENSAYO EXPERIMENTAL, TOMA DE MUESTRAS Y AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS DE *Escherichia coli*

Para el ensayo experimental se utilizaron 20 conejos de cruce Neozelandés x Californiano de 45 días de vida aproximadamente. El estudio se llevó a cabo en una nave bajo ambiente controlado en la cual no se administraba ninguna medicación desde hacía 4 años aproximadamente y las naves ubicadas a la derecha e izquierda de ésta se encontraban totalmente vacías. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos experimentales de 5 conejos cada uno y alojados en 4 jaulas independientes durante todo el ensayo con 2 jaulas vacías intermedias. La distribución de los lotes se realizó en función de la dosis de doxiciclina administrada vía oral por litro de agua de bebida y según el tiempo de tratamiento (figura 1). De esta manera, los grupos sometidos a experimentación quedaron conformados como se especifica a continuación:

- Grupo 1: Animales control no tratados.
- Grupo 2: Animales tratados con 100 mg de doxiciclina/L de agua de bebida, durante 6 días: pauta estándar o dosis terapéutica.
- Grupo 3: Animales tratados con 50 mg de doxiciclina/L de agua de bebida durante 12 días: dosis subterapéutica durante el doble del tiempo.
- Grupo 4: Animales tratados con 200 mg de doxiciclina/L de agua de bebida durante 3 días: dosis superior a la terapéutica durante la mitad del tiempo.

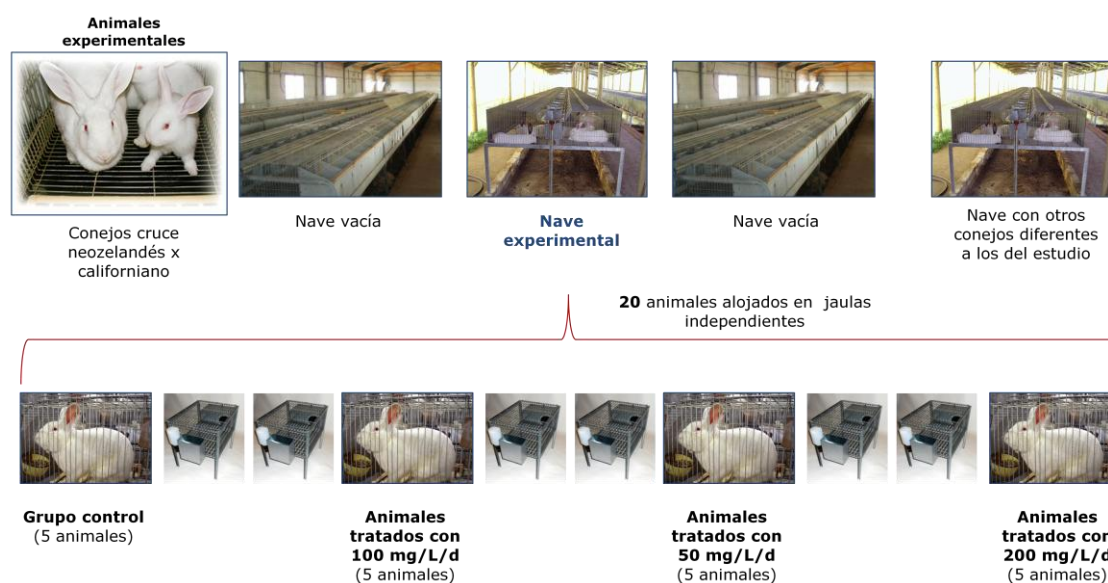


Figura 2.1. Distribución de los animales experimentales según el diseño del ensayo

Las soluciones del antimicrobiano que se administraron a los animales se prepararon diariamente a partir de polvo oral soluble.

Los pesos medios iniciales de los animales según cada uno de los grupos fueron:

- 1,31 kg \pm 0,21 g en los animales del grupo control,
- 1,30 kg \pm 0,18 g en los animales tratados con la dosis terapéutica,
- 1,28 kg \pm 0,19 g en los animales tratados con la dosis subterapéutica,
- 1,28 kg \pm 0,20 g en los animales tratados con la dosis superior a la terapéutica.

Los consumos diarios promedio de doxiciclina en los animales tratados se calcularon en función del peso inicial (día 0), y del peso de los animales de cada grupo al final del tratamiento. Los valores obtenidos para cada grupo por día fueron:

- 8,11 \pm 0,47 mg/kg p.v. en los animales tratados con 50 mg/L,
- 14,12 \pm 0,81 mg/kg p.v. en los animales tratados con 100 mg/L,
- 23,95 \pm 1,67 mg/kg p.v. en los animales tratados con 200 mg/L.

Para realizar la recogida de las muestras fecales se procedió a colocar previamente a cada animal un collarín en la mañana hasta la expulsión de los primeros cecotrofos para evitar que fueran reingeridos para un segundo tránsito digestivo. Los cecotrofos, que son heces blandas ricas en bacterias y proteínas, son frecuentemente expulsados por las mañanas cuando los animales se encuentran en reposo.

Las muestras se recogieron en tres momentos diferentes:

- Antes de iniciar el tratamiento (AT)
- Luego de finalizado el tratamiento (FT)
- Transcurridas 4 semanas desde la finalización del tratamiento (PT).

En el grupo control las muestras se tomaron en los mismos tiempos que en el grupo de animales tratados con la pauta estándar o dosis terapéutica.

Las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta su transporte al laboratorio, donde se congelaron a -70°C hasta el momento de su procesado.

De cada muestra de heces se tomó un gramo que se suspendió en 10 ml de agua de peptona tamponada (BPW, Merck). Una vez homogeneizada la muestra, se procedió a realizar con un hisopo estéril la siembra por agotamiento en placas de

agar McConkey (Merck) que se incubaron a 37°C durante 24 horas. Tras obtener colonias aisladas, de cada placa se seleccionaron y resembraron 10 colonias con características morfológicas típicas de *Escherichia coli* en agar triptona soja (TSA, Merck) haciendo hasta 4 pases por colonia. A partir del último pase se llevó a cabo la identificación hasta el nivel de especie a través del sistema Vitek Junior® (bioMérieux®). Los aislados se conservaron a -70°C.

3.2. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

La determinación de la sensibilidad *in vitro* de los aislados de *E. coli* frente a diferentes antimicrobianos se realizó mediante el sistema de difusión con discos impregnados con antimicrobianos, siguiendo las normas del *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, anteriormente NCCLS) M2-A9 (CLSI, 2006) y M31-A3 (CLSI, 2008).

3.2.1. Medios de cultivo utilizados

El crecimiento bacteriano preliminar, por tratarse de una bacteria de crecimiento rápido, se llevó a cabo en medio de cultivo agar Luria-Bertani (LBA, USB Corporation-USA).

Para el análisis de la sensibilidad en placas a los diferentes antimicrobianos por el método de difusión con disco se utilizaron placas con agar Mueller-Hinton (MHA, bioMérieux®), medio no selectivo y no diferencial suplementado con iones calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}), (CLSI, 2006).

La preparación de las suspensiones bacterianas se llevó a cabo en una solución estéril de cloruro de sodio al 0.45% (bioMérieux®).

3.2.2. Discos con antimicrobianos

El estudio de la sensibilidad *in vitro* se llevó a cabo utilizando discos de Neo-Sensitabs™ (Rosco Diagnostica A/S, Dinamarca). En este sistema se emplean unas tabletas rígidas de material inerte de 9 mm de diámetro fabricadas en condiciones estériles, y a las que se les han añadido los antimicrobianos correspondientes en forma cristalina y a concentraciones conocidas y preestablecidas, según la normativa del CLSI (CLSI, 2006).

Además de la sensibilidad a la doxiciclina (derivado semisintético de la tetraciclina) como antimicrobiano objeto de estudio, se determinó la sensibilidad a otros antimicrobianos que se emplean actualmente con fines terapéuticos siendo la potencia o concentración de los discos para cada uno de ellos la siguiente: doxiciclina (80 µg), amoxicilina (30 µg), gentamicina (40 µg), eritromicina (78 µg), enrofloxacin (10 µg) y colistina (150 µg). Para la selección de estos antimicrobianos se consideró que tuviesen diferentes mecanismos de acción y que fuesen de uso frecuente en la práctica Veterinaria.

3.2.3. Antibiógramas

El método utilizado se basó en la normativa M2-A9 del CLSI (CLSI, 2006) que incluye los siguientes pasos:

1. Se cultivaron los aislados bacterianos en medio LBA a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18 – 24 horas, en atmósfera aerobia.
2. A partir de los crecimientos obtenidos tras el primer paso se prepararon suspensiones bacterianas en solución salina en tubos de plástico estériles de 5 ml, y se ajustaron con un fotocolorímetro con filtro de 450 nm a la turbidez del estándar 0.5 de la escala de sulfato de bario de McFarland. Estas suspensiones bacterianas contenían del orden de 1.00×10^8 UFC/ml.
3. Dentro de un lapso de tiempo no superior a 15 minutos y utilizando un hisopo de algodón estéril empapado en la suspensión bacteriana, del que se eliminó el exceso de líquido presionando fuertemente contra las superficies laterales del tubo, se extendió la suspensión por toda la superficie de las placas de Mueller-Hinton, previamente atemperadas a 37°C y con la superficie seca, en tres direcciones diferentes, rotando cada vez 1/3 la orientación de la placa.
4. A continuación, se dispensaron los seis discos de Neo-Sentitabs™ por cada placa con los antimicrobianos correspondientes, utilizando los dispensadores de discos suministrados por el fabricante (Rosco Diagnostica A/S, Dinamarca).
5. Las placas de Mueller-Hinton se incubaron en aerobiosis en estufa a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18 – 24 horas.
6. Tras este período de incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición en mm correspondientes a cada antimicrobiano por la parte inferior de las placas con la ayuda de un vernier o pie de rey digital.

7. Los halos fueron interpretados siguiendo las indicaciones de la normativa del CLSI anteriormente mencionada lo que permitió catalogar a cada uno de los aislados como sensible, intermedio o resistente frente a cada uno de los antimicrobianos estudiados (tabla 3.1).

Para la validación del método se incluyó la cepa control de *E. coli* ATCC 25922 de sensibilidad conocida (CLSI, 2006).

Tabla 3.1. Interpretación de los antibiogramas en función del diámetro de los halos de inhibición para los antimicrobianos estudiados

| Antimicrobiano/potencia | Diámetro del halo de inhibición en mm | | |
|---------------------------------|---------------------------------------|------------|------------|
| | Sensible | Intermedio | Resistente |
| Doxiciclina 80 µg ¹ | ≥23 | 22 - 20 | ≤19 |
| Amoxicilina 30 µg ¹ | ≥20 | 19 - 17 | ≤16 |
| Gentamicina 40 µg ¹ | ≥25 | 24 - 21 | ≤20 |
| Eritromicina 78 µg ¹ | ≥26 | 25 - 23 | ≤22 |
| Enrofloxacin 10 µg ¹ | ≥23 | 22 - 17 | ≤16 |
| Colistina 150 µg ² | ≥20 | 19 - 17 | ≤16 |

¹ CLSI, 2008

² Guía del usuario (ROSCO-DIAGNÓSTICA, 2005/2006)

3.3. DETECCIÓN DE GENES QUE CODIFICAN RESISTENCIA A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS

Los genes que codifican resistencia se estudiaron en función del número de aislados resistentes a cada antimicrobiano encontrado en el estudio de sensibilidad, por lo que en algunos casos se analizaron todos los aislados de *E. coli* resistentes y en otros se seleccionó una muestra de ellos teniendo en cuenta su distribución en cada una de las fases experimentales, de la dosis de doxiciclina administrada y de los animales de procedencia.

La detección de los genes se llevó a cabo a través de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR en sus siglas en inglés). Todas las reacciones se realizaron en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) utilizando controles positivos para los diferentes grupos de antimicrobianos estudiados y controles negativos sin ADN ajustado al volumen correspondiente con agua bidestilada estéril (MiliQ).

3.3.1. Extracción de ADN

El procedimiento se realizó mediante un método de extracción rápido (método del hervido). Previamente se sembraron los aislados de *E. coli* en medio de cultivo LBA y se incubaron a 37°C durante 18 a 24 horas para su posterior recuperación. El ADN se obtuvo a partir del sobrenadante de una suspensión bacteriana en 100 µl de agua, mantenida a 100°C durante 10 minutos para producir la lisis bacteriana y centrifugada a 5.590 x *g* durante 8 minutos. Los extractos se mantuvieron a -20°C hasta su utilización para el análisis por PCR.

3.3.2. Oligonucleótidos y condiciones de amplificación

Los oligonucleótidos empleados para la detección de los genes que codifican resistencia a los diferentes antimicrobianos estudiados fueron sintetizados por la casa comercial Sigma-Aldrich™ (España) y se describen conjuntamente con las condiciones de amplificación de la PCR en cada uno de los protocolos utilizados.

3.3.3. Electroforesis de corriente continua

La electroforesis de todos los productos de PCR se realizó en geles de agarosa D1 (Pronadisa-Conda, España) entre 1 y 2,5%, según el tamaño de las bandas esperadas, en tampón Tris-Acetato EDTA (TAE) al 1X (Bio-Rad). Se utilizó una corriente eléctrica entre 80 y 100V durante 40 minutos y un marcador de peso molecular *Step Ladder* de 50 - 3000 bp (Sigma-Aldrich™, España).

3.3.4. Tinción y visualización

La visualización del ADN separado por electroforesis se realizó mediante la tinción de los geles con *SYBR® Safe DNA gel stain* de Invitrogen. Para la visualización de las bandas amplificadas se utilizó el sistema de documentación de geles *GeneFlash* (SYNGENE).

3.3.5. Detección de genes que codifican resistencia a tetraciclinas

Los genes que codifican resistencia a tetraciclinas incluidos en este estudio fueron *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, asociados a un mecanismo de bomba de flujo, y *tet(M)* relacionado con la protección de la diana ribosómica.

Se empleó una PCR múltiple para el estudio de los genes *tet(A)* y *tet(B)* y una PCR simple para los genes *tet(C)* y *tet(M)* utilizando los oligonucleótidos y condiciones de amplificación que se describen en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para la detección de genes que codifican resistencia a tetraciclinas

| Gen | Secuencia (5' – 3') | Orientación | Tamaño amplicón (pb) | Referencia |
|----------------------------|--|--------------------|----------------------|--------------------------|
| <i>tet(A)</i> ¹ | GCTACATCCTGCTTGCCTTC CATAGATCGCCGTGAAGAGG | Directo Inverso | 210 | Ng y col., 2001 |
| <i>tet(B)</i> ¹ | TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG GTAATGGGCCAATAACACCG | Directo Inverso | 659 | |
| <i>tet(M)</i> ¹ | GTGGACAAAGGTACAACGAG CGGTAAAGTTCGTCACACAC | Directo Inverso | 400 | |
| <i>tet(C)</i> ² | TCTAACAATGCGCTCATCGT GGTTGAAGGCTCTCAAGGGC | Directo Inverso | 570 | Guardabassi y col., 2000 |

¹ Condiciones de amplificación para genes *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(M)*: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C-5 min.; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C-1 min., hibridación a 51°C-1 min. y extensión a 72°C-1.5 min.; 1 ciclo de extensión final a 72°C-10 min. (Ng y col., 2001).

² Condiciones de amplificación para *tet(C)*: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C-5 min.; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C-1 min., hibridación a 62°C-1 min. y extensión a 72°C-1 min.; 1 ciclo de extensión final a 72°C-10 min. (Modificado a partir de Guardabassi y col., 2000).

Los volúmenes y concentraciones finales de cada uno de los componentes empleados en un volumen final de reacción de 50 µl fueron (Ng y col., 2001):

- 0,5 µl de tampón de PCR, GeneAmp® PCR Gold Buffer (Applied Biosystems-Roche) a una concentración final de 1X.
- 0,6 µl de mezcla de dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP, GeneAmp® (Applied Biosystem-Roche) a una concentración final de 0,3 mM.
- 6 µl de cloruro de magnesio (MgCl₂) - (Applied Biosystem-Roche) a una concentración final de 3 mM.

- 1,0 µl del oligonucleótido *tet(A)* directo e inverso a una concentración final de 1,0 µM y 0,25 µl del oligonucleótido *tet(B)* directo e inverso a una concentración final de 0.25 µM.
- 0,5 µl de *AmpliTaQ Gold*[®] ADN polimerasa (Applied Biosystems-Roche) a una concentración final de 0,05 U/µl.
- 2 µl de ADN.
- Agua bidestilada estéril hasta completar volumen final.

En las dos PCR simple para la detección de los genes *tet(C)* y *tet(M)* se emplearon los mismos volúmenes y concentraciones de los componentes anteriormente señalados, añadiendo 0,5 µl del oligonucleótido directo e inverso a una concentración final de 0,5 µM tanto para *tet(C)* como para *tet(M)*.

Se incluyeron los controles positivos descritos en la siguiente tabla:

Tabla 3.3. Cepas empleadas como controles positivos para la detección por PCR de genes que codifican resistencia a tetraciclinas

| Cepa Control | Portadora de genes | Fuente de obtención |
|--|----------------------------------|--|
| <i>E. coli</i> Co228 | <i>tet(A)</i> y <i>aac(3)-IV</i> | C. Torres. Facultad de Ciencias, Departamento de Agricultura y Alimentación, Universidad de La Rioja, Logroño, España. |
| <i>E. coli</i> Co71 | <i>tet(B)</i> | |
| <i>E. coli</i> Pn249 (origen fecal-humano) | <i>tet(C)</i> | |
| <i>Enterococcus spp</i> C-130 | <i>tet(M)</i> | I. Badiola. Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), Barcelona, España. |

3.3.6. Detección de genes que codifican resistencia a betalactámicos

Los genes estudiados para esta familia de antimicrobianos y que forman parte del grupo de las llamadas β-lactamasas de espectro extendido (BLEEs) fueron *bla_{TEM}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{SHV}* y *bla_{CTX-M-9}* (grupo CTX-M-9).

Se empleó una PCR múltiple para el estudio de los genes *bla_{TEM}*, *bla_{OXA-1}* y *bla_{SHV}* y una simple para *bla_{CTX-M-9}*, utilizando los oligonucleótidos y condiciones de amplificación que se describen en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para la detección de genes que codifican resistencia a betalactámicos

| Gen | Secuencia (5' – 3') | Orientación | Tamaño amplicón (pb) | Referencia |
|--|---|--------------------|----------------------|---------------------------|
| <i>bla</i> _{TEM} ¹ | ATCAGCAATAAACCCAGC CCCCGAAGAACGTTTTC | Directo Inverso | 516 | Mabilat y Courvalin, 1990 |
| <i>bla</i> _{OXA-1} ¹ | ATATCTCTACTGTTGCATCTCC AAACCCCTTCAAACCATCC | Directo Inverso | 619 | Colom y col., 2003 |
| <i>bla</i> _{SHV} ¹ | AGGATTGACTGCCTTTTTG ATTGCTGATTTCGCTCG | Directo Inverso | 192 | |
| <i>bla</i> _{CTX-M-9} ² | I _{ATG} : GTGACAAAGAGAGTGCAACGG I _{STOP} : ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC | Directo Inverso | 854 | Garcia y col., 2005 |

¹ Condiciones de amplificación para genes *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1} y *bla*_{SHV}: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C-5 min.; 32 ciclos de desnaturalización a 94°C-30 seg., hibridación a 54°C-30 seg. y extensión a 72°C-1 min.; 1 ciclo de extensión final a 72°C-10 min. (Colom y col., 2003).

² Condiciones de amplificación para *bla*_{CTX-M-9}: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C-5 min.; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C-40 seg., hibridación a 55°C-40 seg. y extensión a 72°C-1 min.; 1 ciclo de extensión final a 72°C-7 min. (Modificado a partir de Archambault y col., 2006).

Los volúmenes y concentraciones finales de cada uno de los componentes empleados en la PCR múltiple para el estudio de los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1} y *bla*_{SHV} en un volumen final de reacción de 25 µl fueron (Colom y col., 2003):

- 2,5 µl de tampón de PCR, GeneAmp® PCR Gold Buffer (Applied Biosystems-Roche) a una concentración final de 1X.
- 0,2 µl de mezcla de dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP, GeneAmp® (Applied Biosystem-Roche) a una concentración final de 0,2 mM.
- 1,5 µl de cloruro de magnesio (MgCl₂) - (Applied Biosystem-Roche) a una concentración final de 1,5 mM.
- 0,5 µl del oligonucleótido *bla*_{TEM} directo e inverso a una concentración final de 1,0 µM.
- 0,75 µl del oligonucleótido *bla*_{OXA-1} directo e inverso a una concentración final de 1,5 µM.
- 0,25 µl del oligonucleótido *bla*_{SHV} directo e inverso a una concentración final de 0,5 µM.
- 0,2 µl de AmpliTaq Gold® ADN polimerasa (Applied Biosystems-Roche) a una concentración final de 0,04 U/µl.
- 2 µl de ADN.
- Agua bidestilada estéril hasta completar volumen final.

En la PCR simple para el estudio del gen *bla*_{CTX-M-9} se utilizó el *Kit PureTaq™ Ready To-Go™ PCR Beads* (GE Healthcare, Reino Unido), que incluye las concentraciones finales de los siguientes componentes:

- ~2,5 unidades de ADN polimerasa.
- 200 µM de cada dNTP.
- 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl.
- 1,5 mM de MgCl₂.

Se trabajó con un volumen final de 25 µl que incluyó:

- 1 µl de cada oligonucleótido (Directo e Inverso), ambos a una concentración final de 5 pmol.
- 5 µl de ADN obtenido a partir del sobrenadante de una suspensión bacteriana en 700 µl de H₂O hervida a 100°C durante 10 minutos.
- Agua bidestilada estéril hasta completar volumen final.

Este protocolo se empleó según el procedimiento utilizado en el Laboratorio de Enterobacterias del Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid (A. Echeita, comunicación personal).

En los aislados positivos a *bla*_{CTX-M-9} se purificaron las bandas amplificadas a partir del gel de agarosa al 1,5% mediante el kit comercial *SpinPrep™ Gel DNA Kit* (Novagen®, Canadá) que permite la adsorción del ADN a una membrana de sílice en presencia de altas concentraciones de sales y su posterior elución con agua o un tampón específico con bajo contenido en sales. Los productos purificados fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) - Secugen S.L (Madrid). Las secuencias obtenidas fueron alineadas con el programa informático Vector NTI® Advance, versión 9.0 (Invitrogen™).

Se usó el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comprobar que los aislados portaban el gen *bla*_{CTX-M-9} mediante la comparación con la secuencia del gen correspondiente disponible en el GenBank.

Se incluyeron los controles positivos descritos en la siguiente tabla:

Tabla 3.5. Cepas empleadas como controles positivos para la detección por PCR de genes que codifican resistencia a betalactámicos

| Cepa Control | Portadora de genes | Fuente de obtención |
|---|---|--|
| <i>E. coli</i> A3AGEC 425-427 | <i>bla</i> _{TEM} y <i>bla</i> _{SHV} | M.A. Moreno. Centro de Vigilancia Veterinaria (VISAVET), UCM, España. |
| <i>Salmonella</i> spp. | <i>bla</i> _{OXA-1} | K. Colom. Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco, Vitoria-Gasteiz, España. |
| <i>Enterobacter cloacae</i> 03-577, aislado de un brote hospitalario (Utrecht, Netherlands, 2003) | <i>bla</i> _{CTX-M-9} | F.M. Aarestrup. Department of Microbiology and Risk Assessment, National Food Institute, Technical University of Denmark. |

3.3.7. Detección de genes que codifican resistencia a aminoglucósidos

Los genes de resistencia a los aminoglucósidos estudiados fueron *aac(3)-IIa*, *aac(3)-IVa* y *ant(2'')-Ia* que codifican una aminoglucósido N-acetiltransferasa tipo II, una aminoglucósido N-acetiltransferasa tipo IV y una aminoglucósido O-adeniltransferasa respectivamente.

Se estandarizó una PCR múltiple para el estudio de los 3 genes mencionados utilizando los oligonucleótidos y condiciones de amplificación que se describen en la tabla 3.6:

Tabla 3.6. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para la detección de genes que codifican resistencia a aminoglucósidos

| Gen | Secuencia (5' – 3') | Orientación | Tamaño amplicón (pb) | Referencia |
|--------------------|--|--------------------|----------------------|------------------------------|
| <i>aac(3)-IIa</i> | TGAAACGCTGACGGAGCCTC GTCGAACAGGTAGCACTGAG | Directo Inverso | 369 | (Sandvang y Aarestrup, 2000) |
| <i>aac(3)-IVa</i> | GTGTGCTGCTGGTCCACAGC AGTTGACCCAGGGCTGTCGC | Directo Inverso | 627 | |
| <i>ant(2'')-Ia</i> | ATGTTACGCAGCAGGGCAGTCG CGTCAGATCAATATCATCGTGC | Directo Inverso | 194 | (Vanhoof y col., 1992) |

Condiciones de amplificación: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C-5 min.; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C-30 seg., hibridación a 55°C-45 seg. y extensión a 72°C-2 min.; 1 ciclo de extensión final a 72°C-3 min. (Modificado a partir de Vanhoof y col., 1992).

Los volúmenes y concentraciones finales de cada uno de los componentes empleados en un volumen final de reacción de 50 µl fueron (Vanhoof y col., 1992):

- 5 µl de tampón de PCR, GeneAmp® *PCR Gold Buffer* (Applied Biosystems-Roche) a una concentración final de 1X.
- 0,4 µl de mezcla de dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP, GeneAmp® (Applied Biosystem-Roche) a una concentración final de 0,2 mM.
- 3 µl de cloruro de magnesio (MgCl₂) – (Applied Biosystem-Roche) a una concentración final de 1,5 mM.
- 0,5 µl del oligonucleótido *aac(3)-IIa* directo e inverso a una concentración final de 1,0 µM.
- 0,5 µl del oligonucleótido *aac(3)-IVa* directo e inverso a una concentración final de 1,0 µM.
- 0,5 µl del oligonucleótido *ant(2'')-Ia* directo e inverso a una concentración final de 1,0 µM.
- 0,2 µl de *AmpliTaq Gold*® ADN polimerasa (Applied Biosystems-Roche) a una concentración final de 0,02 U/µl.
- 2 µl de ADN.
- Agua bidestilada estéril hasta completar volumen final.

Se incluyeron los controles positivos descritos en la siguiente tabla:

Tabla 3.7. Cepas empleadas como controles positivos para la detección por PCR de genes que codifican resistencia a aminoglucósidos

| Cepa Control | Portadora de genes | Fuente de obtención |
|--------------------|--------------------|---|
| <i>E. coli</i> K8 | <i>aac(3)-IIa</i> | F.M. Aarestrup. Department of Microbiology and Risk Assessment, National Food Institute, Technical University of Denmark. Copenhagen. |
| <i>E. coli</i> K13 | <i>aac(3)-IVa</i> | |
| <i>E. coli</i> K2 | <i>ant(2'')-I</i> | |

3.3.8. Resistencia a fluoroquinolonas

3.3.8.1. Detección de sustituciones aminoacídicas en la Región Determinante de Resistencia a Quinolonas (QRDR) de *gyrA* y *parC* (ADN girasa y topoisomerasa IV)

Los genes *gyrA* y *parC* se amplificaron por PCR simple utilizando los oligonucleótidos descritos en la tabla 3.8. Posteriormente se purificaron los fragmentos amplificados mediante el uso del kit comercial *SpinPrep*™ *PCR Clean-Up*

Kit (Novagen®) y se secuenciaron en el Servicio de Secuenciación del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) - Secugen S.L (Madrid), usando el mismo juego de oligonucleótidos empleados en la reacción de PCR. Las secuencias obtenidas fueron traducidas a proteínas con el programa informático Vector NTI® Advance, versión 9.0 (Invitrogen™) y comparadas con la secuencia aminoacídica previamente descrita para *gyrA* (número de acceso del GenBank NP_416734.1) y *parC* (NP_755631.1) para determinar las posibles mutaciones presentes en las QRDRs de ambos genes.

Tabla 3.8. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para los genes *gyrA* y *parC*

| Gen | Secuencia (5' – 3') | Orientación | Tamaño amplicón (pb) | Referencia |
|-------------|---|--------------------|----------------------|--------------------|
| <i>gyrA</i> | ACGTACTAGGCAATGACTGG AGAAGTCGCCGTCGATAGAAC | Directo Inverso | 191 | (Lee y col., 2005) |
| <i>parC</i> | TGTATGCGATGTCTGAACTG CTCAATAGCAGCTCGGAATA | Directo Inverso | 264 | |

Condiciones de amplificación: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C-5 min.; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C-1 min., hibridación a 55°C-1 min. y extensión a 72°C-1 min.; 1 ciclo de extensión final a 72°C-5 min. (Modificado a partir de Vanhoof, 1992).

Los volúmenes y concentraciones finales de cada uno de los componentes empleados en un volumen final de reacción de 50 µl fueron (Lee y col., 2005):

- 5 µl de tampón de PCR, GeneAmp® PCR Gold Buffer (Applied Biosystems-Roche) a una concentración final de 1X.
- 0,4 µl de mezcla de dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP, GeneAmp®, Applied Biosystem-Roche a una concentración final de 0,2 mM.
- 6 µl de cloruro de magnesio (MgCl₂) – (Applied Biosystem-Roche) a una concentración final de 3 mM.
- 0,2 µl del oligonucleótido *gyrA* directo e inverso a una concentración final de 0,2 µM, o
- 0,2 µl del oligonucleótido *parC* directo e inverso a una concentración final de 0,2 µM.
- 0,5 µl de *AmpliTaQ Gold*® ADN polimerasa (Applied Biosystems-Roche) a una concentración final de 0,05 U/µl.
- 2 µl de ADN.
- Agua bidestilada estéril hasta completar volumen final.

3.3.8.2. Resistencia a fluoroquinolonas mediada por plásmidos

Los genes estudiados y que están involucrados en la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos fueron el gen *qnr*, variantes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS*, el gen *aac(6')Ib*, que codifica una enzima que inactiva el antimicrobiano, y el gen *qepA* cuyo mecanismo de resistencia está asociado a una bomba de flujo o de expulsión activa.

Se realizó una PCR múltiple para el estudio de las variantes del gen *qnr* y una PCR simple para los genes *aac(6')Ib* y *qepA* utilizando los oligonucleótidos descritos en la tabla 3.9.

Tabla 3.9. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para la detección de genes que codifican resistencia a fluoroquinolonas mediada por plásmidos

| Gen | Secuencia (5' – 3') | Orientación | Tamaño amplicón (pb) | Referencia |
|-------------------------------|--|--------------------|----------------------|--|
| <i>qnrA</i> ¹ | GGATGCCAGTTTCGAGGA TGCCAGGCACAGATCTTG | Directo Inverso | 492 | Cavaco y col., 2008 |
| <i>qnrB</i> ¹ | GGATGCCAGTTTCGAGGA TGCCAGGCACAGATCTTG | Directo Inverso | 562 | Jacoby y col., 2006 |
| <i>qnrS</i> ¹ | CGACGTGCTAACTTGCGTGATA TACCCAGTGCTTCGAGAATCAG | Directo Inverso | 537 | Cavaco y col., 2008 |
| <i>aac(6')Ib</i> ² | TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA CTCGAATGCCTGGCGTGTTC | Directo Inverso | 482 | Park y col., 2006; Kim y col., 2009b |
| <i>qepA</i> ³ | GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG GGACATCTACGGCTTCTTCG | Directo Inverso | 617 | Yamane y col., 2008; Rocha-Gracia y col., 2010 |

¹ Condiciones de amplificación gen *qnr*: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C-5 min.; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C-1 min., hibridación a 57°C-1 min. y extensión a 72°C-1 min.; 1 ciclo de extensión final a 72°C-10 min. (Modificado a partir de Cavaco y col., 2008).

² Condiciones de amplificación gen *aac(6')Ib*: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C-5 min.; 34 ciclos de desnaturalización a 94°C-45 seg., hibridación a 55°C-45 seg. y extensión a 72°C-45 seg.; 1 ciclo de extensión final a 72°C-10 min. (Park y col., 2006).

³ Condiciones de amplificación gen *qepA*: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 96°C-1 min.; 30 ciclos de desnaturalización a 96°C-1 min., hibridación a 60°C-1 min. y extensión a 72°C-1 min.; 1 ciclo de extensión final a 72°C-7 min. (Yamane y col., 2008).

Los volúmenes y concentraciones finales de cada uno de los componentes empleados en un volumen final de reacción de 50 µl para el caso de los genes *qnr* (Cavaco y col., 2008) fueron:

- 5 µl de tampón de PCR, GeneAmp® *PCR Gold Buffer* (Applied Biosystems-Roche), concentración final de 1X.
- 0,5 µl de mezcla de dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP, GeneAmp® (Applied Biosystem-Roche), concentración final de 0,25 mM.
- 3 µl de cloruro de magnesio (MgCl₂) – (Applied Biosystem-Roche) a una concentración final de 1,5 mM.
- 1 µl del oligonucleótido *qnrA* directo e inverso, concentración final de 1 µM.
- 1 µl del oligonucleótido *qnrB* directo e inverso, concentración final de 1 µM.
- 1 µl del oligonucleótido *qnrS* directo e inverso, concentración final de 1 µM.
- 0,2 µl de *AmpliTaq Gold*® ADN polimerasa (Applied Biosystems-Roche), concentración final de 0,02 U/µl.
- 2 µl de ADN.
- Agua bidestilada estéril hasta completar volumen final.

Para el caso de de la PCR simple para la detección de *aac(6')/b* se utilizaron los mismos volúmenes y concentraciones de los componentes anteriormente señalados, añadiendo 1 µl del oligonucleótido directo e inverso a una concentración final de 1 µM (Park y col., 2006).

Para *qepA* se empleó una PCR simple utilizando el *Kit PureTaq™ Ready To-Go™ PCR Beads* (GE Healthcare, Reino Unido), cuyas concentraciones y volúmenes finales de cada componente se mencionan en el apartado 3.3.6. Los productos obtenidos en la reacción de PCR se purificaron, secuenciaron y analizaron como se describe en el mismo apartado.

Se incluyeron los controles positivos descritos en la siguiente tabla:

Tabla 3.10. Cepas empleadas como controles positivos para la detección por PCR de genes que codifican resistencia a fluoroquinolonas

| Cepa Control | Portadora de genes | Fuente de obtención |
|---|--------------------|---|
| <i>Enterobacter cloacae</i> 03-577, aislado de un brote hospitalario (Utrecht, Netherlands, 2003) | <i>qnrA1</i> | F.M. Aarestrup. Department of Microbiology and Risk Assessment, National Food Institute, Technical University of Denmark. Copenhagen. |
| <i>Salmonella bovis</i> <i>morbificans</i> <i>qnrS1</i> (aislado en US) | <i>qnrS1</i> | |
| <i>Salmonella infantis</i> S14 (aislado en Brasil) | <i>aac(6)Ib</i> | |
| <i>E. coli</i> 137 | <i>qnrB</i> | L. Martínez. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla y Departamento de Biología Molecular. |
| <i>E. coli</i> TOP10 (PAT851) | <i>qepA</i> | J. Vila. Servicio de Microbiología del Hospital Clínico de Barcelona, España. |

3.4. ESTUDIO DE LOS PERFILES REP Y DE LAS RELACIONES CLONALES ENTRE LOS AISLADOS DE *E. coli*

La identificación de clones o grupos clonales entre aislados posiblemente relacionados epidemiológicamente se llevó a cabo a través de la técnica de REP-PCR o PCR de elementos extragénicos palindrómicos repetitivos (Versalovic y col., 1991). Entendiéndose por clones los individuos de una especie que tienen un perfil similar para un grupo particular de marcadores genéticos (van Belkum y col., 2001).

Esta técnica se aplicó a la totalidad de los aislados analizados en el estudio.

3.4.1. Extracción del ADN

La extracción del ADN se realizó mediante el método del hervido como se mencionó en el apartado 3.3.1., solo que en este caso el ADN se obtuvo a partir del sobrenadante de una suspensión bacteriana en 700 µl de agua hervida.

3.4.2. Oligonucleótidos y reacción de REP-PCR

Se emplearon los oligonucleótidos modificados con inosina y las condiciones de amplificación que se describen en la siguiente tabla:

Tabla 3.11. Oligonucleótidos y condiciones de amplificación empleados en la técnica de REP-PCR

| Secuencia (5' – 3') | Referencia |
|---|-------------------|
| REP-1 IIIGCGCCGICATCAGGC* REP-2 ACGTCTTATCAGGCCTAC | Vila y col., 2005 |

*I:Inosina

Condiciones de amplificación: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C-3 min.; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C-1 min., hibridación a 40°C-1 min. y extensión a 68°C-8 min.; 1 ciclo de extensión final a 72°C-15 min. (Vila y col., 1996).

Los volúmenes y concentraciones finales de cada uno de los componentes empleados en un volumen final de reacción de 50 µl fueron:

- 5 µl de tampón de PCR (Biotools, España), concentración final de 1X.
- 1 µl de mezcla de dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Biotools), concentración final de 0,2 mM.
- 1,5 µl de cloruro de magnesio (MgCl₂) – (Biotools), concentración final de 1,5 mM.
- 1 µl del oligonucleótido REP-1 (Sigma-Aldrich), concentración final de 0,5 µM.
- 1 µl del oligonucleótido REP-2 (Sigma-Aldrich), concentración final de 0,5 µM.
- 0,5 µl de ADN polimerasa (Biotools), concentración final de 0,05 U/µl.
- 20 µl de ADN.
- Agua bidestilada estéril hasta completar volumen final.

La electroforesis de los productos de la REP-PCR se realizó en geles de agarosa al 2% con Tris-acetato EDTA (TAE) al 1X (BioRad) con una corriente eléctrica de 70 voltios durante 2 horas. Los geles se tiñeron con *SYBR® Safe DNA gel stain* (Invitrogen™). Se utilizó el marcador de peso molecular *Step Ladder®* de 50 - 3000 bp (Sigma-Aldrich™). Para la visualización, captación y digitalización de las bandas amplificadas se utilizó el sistema de documentación de geles *GeneFlash* (SYNGENE).

3.4.3. Análisis de los perfiles REP

Para el análisis de las imágenes obtenidas en función de los perfiles de bandas observadas se utilizó el programa informático GelCompar® II (Applied Maths). Las bandas amplificadas fueron normalizadas en base al marcador de peso molecular a través del mismo programa.

La relación entre los perfiles de bandas de los aislados estudiados se estableció aplicando el coeficiente de similitud de Dice con una tolerancia del 5% y optimización del 5%, generándose un dendograma a partir del método del promedio entre grupos UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*) para cada animal en las tres fases del experimento y siguiendo los criterios establecidos por otros autores (McLellan y col., 2003; Cleland y col., 2008; Fontana y col., 2008; Vigil y col., 2009). Los aislados cuyos perfiles presentaban una similitud $\geq 95\%$ se consideraron pertenecientes al mismo clon.

3.5. DETERMINACIÓN DE GRUPOS FILOGENÉTICOS DE LOS AISLADOS DE *E. coli*

Escherichia coli se clasifica desde el punto de vista de su estructura poblacional en cuatro grupos filogenéticos predominantes: A, B1, B2 y D (Selander y col., 1986; Herzer y col., 1990; Clermont y col., 2000) los cuales pueden ser divididos en siete subgrupos (A_0 , A_1 , B1, B2₂, B2₃, D₁ y D₂) (Escobar-Páramo y col., 2004; Carlo y col., 2010). Los filogrupos fueron identificados por PCR múltiple basada en la amplificación de dos genes con función conocida (*chuA* y *yjaA*) y un fragmento de ADN de función desconocida (TspE4.C2), aplicando el criterio mostrado en la figura 2.2 (Clermont y col., 2000) que permitió hacer la discriminación de los aislados estudiados en los correspondiente grupos filogenéticos: B2 (*chuA*+, *yjaA*+), D (*chuA*+, *yjaA*-), B1 (*chuA*-, TspE4.C2+) y A (*chuA*-, TspE4.C2-). Las cepas extraintestinales patógenas pertenecen en su mayoría a los grupos B2 y D, mientras que las cepas comensales intestinales se distribuyen entre los grupos A y B1 (Picard y col., 1998; Soto, 2006).

Los resultados de este ensayo se correlacionaron con los obtenidos por la técnica de REP-PCR.

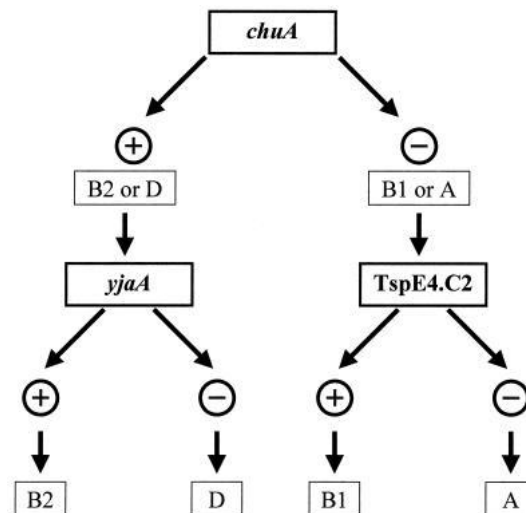


Figura 2.2. Árbol de decisión dicotómico para determinar el grupo filogenético de aislados de *E. coli* usando los resultados de amplificación por PCR de los genes *chuA* y *yjaA* y del fragmento de ADN TspE4.C2 (Tomado de Clermont y col., 2000)

Los oligonucleótidos empleados en esta técnica se describen en la siguiente tabla:

Tabla 3.12. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para la determinación de los grupos filogenéticos de aislados de *E. coli*

| Gen | Secuencia (5' – 3') | Orientación | Tamaño amplicón (pb) | Referencia |
|--------------------------|---|--------------------|----------------------|--------------------------|
| <i>chuA</i> ¹ | GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAGACA | Directo Inverso | 279 | |
| <i>yjaA</i> ² | TGAAGTGTCTCAGGAGACGCTG ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC | Directo Inverso | 211 | Clermont y col., 2000 |
| TspE4C2 ² | GAGTAATGTCGGGGCATTCA CGCGCCAACAAAGTATTACG | Directo Inverso | 152 | |

¹ Condiciones de amplificación gen *chuA*: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C-5 min.; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C-30 seg., hibridación a 63°C-30 seg. y extensión a 72°C-30 seg.; 1 ciclo de extensión final a 72°C-7 min. (Clermont y col. 2000).

² Condiciones de amplificación genes *yjaA* y TspE4C2: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C-5 min.; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C-30 seg., hibridación a 55°C-30 seg. y extensión a 72°C-30 seg.; 1 ciclo de extensión final a 72°C-7 min. (Clermont y col., 2000).

El protocolo empleado para la identificación y amplificación individual de los tres marcadores incluyó tres reacciones de PCR simple (Clermont y col., 2000). Los volúmenes y concentraciones finales de cada uno de los componentes empleados en un volumen final de reacción de 25 µl fueron:

- 2,5 µl de tampón estándar de PCR con MgCl₂ (Biotools, España), concentración final de 1X.
- 2 µl de mezcla de dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Biotools), concentración final de 0,8 mM.
- 0,25 µl del oligonucleótido *chuA* directo e inverso (Sigma-Aldrich), concentración final de 0,25 µM.
- 0,25 µl del oligonucleótido *yjaA* directo e inverso (Sigma-Aldrich), concentración final de 0,25 µM.
- 0,25 µl del oligonucleótido TspE4.C2 directo e inverso (Sigma-Aldrich), concentración final de 0,25 µM.
- 0,25 µl de ADN polimerasa (Biotools), concentración final de 0.05 U/µl.
- 2,5 µl de ADN.
- Agua bidestilada estéril hasta completar volumen final.

La electroforesis de los productos amplificados se realizó en geles de agarosa al 2% con Tris-acetato EDTA (TAE) al 1X (Bio-Rad) con un voltaje de 90 durante 40 minutos. Los geles fueron teñidos y visualizados como se explicó en el apartado 3.3.4.

3.6. ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS MEDIADA POR INTEGRONES

La presencia de integrones y su relación con la resistencia a distintos antimicrobianos se investigó según la metodología que se detalla a continuación:

3.6.1. Caracterización de integrones

La determinación de la presencia de integrones se realizó por PCR múltiple utilizando ADN genómico como molde y oligonucleótidos específicos para la amplificación de los genes que codifican las integrasas de integrones de clase 1 (*intI1*), 2 (*intI2*) y 3 (*intI3*) descritos en la tabla 3.13 junto con las condiciones de amplificación.

Tabla 3.13. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para el estudio de integrones

| Gen | Secuencia (5' – 3') | Orientación | Tamaño amplicón (pb) | Referencia |
|--------------|---|--------------------|----------------------|-------------------|
| <i>intI1</i> | ACGAGCGCAAGGTTTCGGT GAAAGGTCTGGTCATACATG | Directo Inverso | 565 | (Su y col., 2006) |
| <i>intI2</i> | GTGCAACGCATTTTGCAGG CAACGGAGTCATGCAGATG | Directo Inverso | 403 | |
| <i>intI3</i> | CATTTGTGTTGTGGACGGC GACAGATACGTGTTTGGCAA | Directo Inverso | 717 | |

Condiciones de amplificación: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C-5 min.; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C-30 seg., hibridación a 54°C-30 seg. y extensión a 72°C-2 min.; 1 ciclo de extensión final a 72°C-7 min. (Modificado a partir de Su y col., 2006).

Los volúmenes y concentraciones finales de cada uno de los componentes empleados en un volumen final de reacción de 25 µl (Su y col., 2006) fueron:

- 2,5 µl de tampón estándar de PCR con MgCl₂ (Biotools, España) a una concentración final de 1X.
- 2,5 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% (Sigma-Aldrich), como agente desnaturalizante que permite una mejor separación de las cadenas de ADN. Este compuesto contribuye a reducir la formación de productos inespecíficos que se generan durante la amplificación.
- 2 µl de mezcla de dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Biotools) a una concentración final de 0,8 mM.
- 0,25 µl del oligonucleótido *intI1* directo e inverso (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0,25 µM.
- 0,25 µl del oligonucleótido *intI2* directo e inverso (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0,25 µM.
- 0,25 µl del oligonucleótido *intI3* directo e inverso (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0,25 µM.
- 0,25 µl de ADN polimerasa (Biotools) a una concentración final de 0,05 U/µl.
- 2,5 µl de ADN.
- Agua bidestilada estéril hasta completar volumen final.

Como control negativo se incluyó una muestra sin ADN y como controles positivos los siguientes:

Tabla 3.14. Cepas empleadas como controles positivos para el estudio de integrones

| Cepa Control | Portadora de la enzima | Fuente de obtención |
|------------------------------------|-----------------------------|---|
| <i>E. coli</i> C-528 | <i>intI1</i> e <i>intI2</i> | M.A. Moreno y M. Marchant. Centro de Vigilancia Veterinaria (VISAVET), UCM, España. |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> C-933 | <i>intI3</i> | |

La electroforesis de los productos de la PCR se realizó en geles de agarosa al 2% con Tris-acetato EDTA (TAE) al 1X (Bio-Rad) con un voltaje de 90 durante 30 minutos. Los geles fueron teñidos y visualizados como se explicó en el apartado 3.3.4.

3.6.2. Amplificación de la región variable del integrón

En los aislados en los que se detectó el gen que codifica la integrasa *intI1* se llevó a cabo una PCR para amplificar la región variable y determinar el tamaño de la misma. El mismo procedimiento se realizó en los aislados en los cuales se detectó el gen de la integrasa clase 2.

Los oligonucleótidos empleados y las condiciones de amplificación se describen en la siguiente tabla:

Tabla 3.15. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para el estudio de la región variable del integrón

| Región variable | Secuencia (5' – 3') | Orientación | Tamaño amplicón (pb) | Referencia |
|-------------------------------|--|--------------------|----------------------|----------------------|
| rv- <i>intI1</i> ¹ | GGCATCCAAGCAGCAAG AAGCAGACTTGACCTGA | Directo Inverso | Variable | Levésque y Roy, 1993 |
| rv- <i>intI2</i> ² | GATGCCATCGCAAGTACGAG CGGGATCCCGGACGGCATGC | Directo Inverso | Variable | White y col., 2001 |

¹ Condiciones de amplificación rv- *intI1*: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C-5 min.; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C-1 min., hibridación a 55°C-1 min. y extensión a 65°C-8 min.; 1 ciclo de extensión final a 72°C-8 min. (Adaptado de Lévesque y Roy., 1993).

² Condiciones de amplificación rv- *intI2*: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C-5 min.; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C-1 min., hibridación a 60°C-1 min. y extensión a 72°C-6 min.; 1 ciclo de extensión final a 72°C-8 min. (Marchant, M., comunicación personal).

Los volúmenes y concentraciones finales de cada uno de los componentes empleados en un volumen final de reacción de 50 µl y siguiendo el protocolo empleado por M.A. Moreno y M. Marchant (comunicación personal) fueron:

- 2,5 µl de tampón estándar de PCR con MgCl₂ (Biotools, España), concentración final de 1X.
- 1,5 µl de mezcla de dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Biotools), concentración final de 0,3 mM.
- 0,25 µl del oligonucleótido *rv-intI1* directo e inverso (Sigma-Aldrich), concentración final de 0,125 µM.
- 0,25 µl del oligonucleótido *rv-intI2* directo e inverso (Sigma-Aldrich), concentración final de 0,125 µM.
- 0,25 µl de ADN polimerasa (Biotools), concentración final de 0,025 U/µl.
- 5 µl de ADN.
- Agua bidestilada estéril hasta completar volumen final.

La electroforesis se realizó como se describió en el apartado 3.4.2.

3.6.2.1. Secuenciación y análisis bioinformático

Se purificaron los productos de PCR con el kit comercial *SpinPrep™ PCR Clean-Up Kit* (Novagen®) y se secuenciaron en la Unidad de Secuenciación del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) - Secugen S.L (Madrid). Seguidamente se analizaron y editaron las secuencias obtenidas con el programa informático Vector NTI® Advance, versión 9.0 (Invitrogen™) y posteriormente se compararon con las secuencias disponibles en las bases de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para llevar a cabo la caracterización de los genes casetes contenidos en la región variable de los integrones clase 1 y 2 de los aislados donde se amplificaron.

3.6.3. Detección de los genes *qacEΔ1+sul1* en integrones de clase 1 defectivos

La detección de los genes *qacEΔ1+sul1* localizados en la región 3' conservada de los integrones de clase 1 y que confieren resistencia a compuestos de amonio cuaternario y sulfamidas respectivamente, se realizó por PCR en los aislados negativos a *intI1* y resistentes a trimetoprim + sulfametoxazol, cuya resistencia fue comprobada por el método de difusión con discos explicado en el apartado 3.2.3, y con una potencia de 1.25 µg y 23.75 µg para cada antimicrobiano respectivamente. La finalidad de este estudio permitiría suponer la presencia de la integrasa de clase 1 en estos aislados, posiblemente truncada por la secuencia de inserción IS26.

Los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación empleadas están descritas en la tabla 3.16:

Tabla 3.16. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para el estudio de genes *qacEΔ1*+*sul1*

| Gen | Secuencia (5' – 3') | Orientación | Tamaño amplicón (pb) | Referencia |
|--------------------|--|--------------------|----------------------|--------------------|
| <i>qac sul</i> | GGCTGGCTTTTCTTGTTATCG GCGAAGGTTTCCGAGAAGGTG | Directo Inverso | 1125 | Mazel y col., 2000 |

Condiciones de amplificación: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C-5 min.; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C-30 seg., hibridación a 63°C-30 seg. y extensión a 72°C-1 min.; 1 ciclo de extensión final a 72°C-8 min. (Mazel y col., 2000).

Los volúmenes y concentraciones finales de cada uno de los componentes empleados en un volumen final de reacción de 50 µl, siguiendo el protocolo empleado por M.A. Moreno y M. Marchant (comunicación personal) fueron:

- 2,5 µl de tampón estándar de PCR con MgCl₂ (Biotools, España), concentración final de 1X.
- 1,5 µl de mezcla de dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Biotools), concentración final de 0,3 mM.
- 0,25 µl del oligonucleótido *qacEΔ1* directo (Sigma-Aldrich), concentración final de 0,125 µM.
- 0,25 µl del oligonucleótido *sul1* inverso (Sigma-Aldrich), concentración final de 0,125 µM.
- 0,25 µl de ADN polimerasa (Biotools), concentración final de 0,025 U/µl.
- 5 µl de ADN.
- Agua bidestilada estéril hasta completar volumen final.

Se incluyó un control positivo de *E. coli* de origen fecal, cepa C-264 proveniente de una granja de cerdos en Vallelado (Segovia) y cedida por VISAVET, portadora de los genes *qacEΔ1*+*sul1* y *sul3*; asimismo, se incluyó un control negativo sin ADN ajustado al volumen correspondiente con agua bidestilada estéril (MiliQ)

La electroforesis se realizó como se describió en el apartado 3.3.4.

3.6.4. PCR para la detección del elemento de inserción IS26

La secuencia de inserción IS26 se estudió por PCR en aquellos aislados de *E. coli* en los cuales no se detectó el gen que codifica la integrasa *intI1* pero eran portadores de los genes *qacEΔ1+sul1* en la región 3'CS. La finalidad de este análisis fue determinar si el elemento IS26 se encontraba truncando o no a la integrasa de clase 1 impidiendo la hibridación de los oligonucleótidos utilizados para la detección de *intI1*.

El procedimiento se basó en dos PCR diferentes ya que la IS26 puede localizarse hacia el extremo 5' o hacia el extremo 3' de la integrasa:

1. Empleando el juego de oligonucleótidos: *intI1* directo (Tabla 3.13) e IS26U inverso (Tabla 3.17), para saber si la integrasa estaba truncada por la IS26 hacia el extremo 5' (*upstream*).
2. Empleando el juego de oligonucleótidos: *intI1* inverso (Tabla 3.13) e IS26U (Tabla 3.17), para saber si la integrasa estaba truncada por la IS26 hacia el extremo 3' (*downstream*).

Tabla 3.17. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para IS26

| Gen | Secuencia (5' – 3') | Orientación | Tamaño amplicón (pb) | Referencia |
|---------|----------------------|-------------|----------------------|----------------------|
| IS26U | AGCGGTAAATCGTGGAGTGA | Directo | 820 | Liao y col., 2010 |
| IS26inv | TCACTCCACGATTTACCGCT | Inverso | | Doublet y col., 2008 |

Condiciones de amplificación: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C-5 min.; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C-1 min., hibridación a 55°C-1 min. y extensión a 65°C-8 min.; 1 ciclo de extensión final a 72°C-8 min. (Lévesque y Roy., 1993).

Los volúmenes y concentraciones finales de cada uno de los componentes empleados en un volumen final de reacción de 25 µl y siguiendo el protocolo empleado por M.A. Moreno y M. Marchant (comunicación personal) fueron:

- 2,5 µl de tampón estándar de PCR con MgCl₂ (Biotools, España), concentración final de 1X.
- 1µl de mezcla de dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Biotools), concentración final de 0,4 mM.
- 0,5 µl de cada oligonucleótido (Sigma-Aldrich), concentración final de 0,1 µM.

- 0,15 µl de ADN polimerasa (Biotools) a una concentración final de 0,03 U/µl.
- 2,5 µl de ADN.
- Agua bidestilada estéril hasta completar volumen final.

La electroforesis fue realizada como se explicó en el apartado 3.4.2.

3.6.5. Detección del gen *sul3*

La detección del gen *sul3* (resistencia a sulfamidas) en la región 3' CS de los integrones clase 1 no clásicos se llevó a cabo por PCR únicamente en aquellos aislados portadores del gen que codifica la integrasa *intI1*, en los cuales no se amplificó la región variable y carentes de *qacEΔ1+sul1*.

Los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación empleadas están descritas en la tabla 3.18:

Tabla 3.18. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y condiciones de amplificación para el estudio del gen *sul3*

| Gen | Secuencia (5' – 3') | Orientación | Tamaño amplicón (pb) | Referencia |
|-------------|---|--------------------|----------------------|--------------------------|
| <i>sul3</i> | GAGCAAGATTTTGAATCG CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA | Directo Inverso | 789 | Perreten y Boerlin, 2003 |

Condiciones de amplificación: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C-1 min.; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C-1 min., hibridación a 51°C-1 min. y extensión a 72°C-1 min.; 1 ciclo de extensión final a 72°C-5 min. (Perreten y Boerlin, 2003).

Los volúmenes y concentraciones finales de cada uno de los componentes empleados se detallan en el apartado 3.6.3.

3.7. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versión 17 para Windows.

Las diferencias estadísticas entre las frecuencias de resistencias antimicrobianas fueron determinadas por el Test exacto de Fischer. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los análisis se hicieron utilizando el software estadístico InStat (versión 3), GraphPad Inc., San Diego, CA.

4 – Resultados y Discusión

“Raro y celestial don, el que sepa sentir y razonar al mismo tiempo”

Vittorio Alfieri

Capítulo 1

Sensibilidad antimicrobiana y detección de genes de resistencia

4.1. AISLAMIENTO DE CEPAS

Como se indicó en el apartado correspondiente de Material y Métodos, el propósito inicial era seleccionar 10 aislados de *E. coli* por animal y fase de tratamiento. No obstante, en determinados casos esto no fue posible bien porque no se obtuvo crecimiento o porque algunos o todos los aislados se identificaron como otras enterobacterias distintas a *E. coli* (*Klebsiella pneumoniae* y *Citrobacter freundii*). En la tabla 4.1 se detallan los resultados de los aislamientos en los 20 animales según el momento de la toma de la muestra y la pauta de tratamiento. Como puede observarse en la tabla, de uno de los animales (conejo N° 20 tratado con dosis baja) no se consiguió aislado alguno de *E. coli* y de otro (conejo N° 16 también tratado con dosis baja) solo se consiguió un aislado de *E. coli* de la muestra tomada en la fase antes del tratamiento. Además, del conejo N° 15 (tratado con dosis alta) solo se obtuvieron 7 aislados (5 de la muestra tomada en la fase AT y 2 de la tomada en la fase FT) y del conejo N° 12 únicamente se obtuvieron aislados de *E. coli* de la muestra tomada en la fase PT. El hecho de que no se hubiese podido aislarse *E. coli* de algunos animales es hasta cierto punto esperable, puesto que según Padilha y col. (1996) hay gazapos sin *E. coli* detectables (menos de 10^2 /g) y otros tienen una población que llega a $10^4 - 10^5$ bacterias por gramo. Estos autores señalan, asimismo, que el 10-20% de los gazapos de 15-22 días no tienen *E. coli* y la proporción llega al 30% en los conejos mayores estudiados hasta los 49 días. Finalmente se obtuvieron un total de 478 aislados de *E. coli* a partir de las muestras fecales en lugar de los 600 teóricos programados. De los aislados, 156 procedían de las muestras tomadas en la fase previa a la administración del tratamiento, 152 de las muestras tomadas al final del tratamiento y los restantes 170 de las muestras tomadas cuatro semanas después de finalizado el tratamiento.

Los resultados obtenidos en esta investigación son difíciles de comparar con los hallazgos publicados en trabajos previos debido a que en nuestro caso se trató de obtener diez aislados de *E. coli* de cada animal en tres momentos diferentes según el diseño experimental planteado, mientras que en otras investigaciones de tipo descriptivo los animales y los aislados bacterianos son considerados de manera independiente.

Tabla 4.1. Resultados de los aislamientos de *E. coli* y otras enterobacterias según el animal de procedencia, la pauta de tratamiento y el momento de la toma de la muestra

| Pauta ^a | Nº de animal | Aislados según el momento de la toma de la muestra | | |
|--------------------|--------------|--|--|---------------------------------|
| | | Antes del inicio del tratamiento | Final del tratamiento | Post tratamiento |
| Control | 1 | 10 <i>Klebsiella pneumoniae</i> | * | * |
| Control | 2 | * | * | * |
| Control | 3 | * | Sin aislamiento | * |
| Control | 4 | * | * | * |
| Control | 5 | * | * | * |
| Baja | 16 | 1 <i>E. coli</i> , 9 <i>Citrobacter freundii</i> | 10 <i>Citrobacter freundii</i> | 10 <i>Citrobacter freundii</i> |
| Baja | 17 | * | * | * |
| Baja | 18 | * | * | * |
| Baja | 19 | * | * | * |
| Baja | 20 | Sin aislamiento | 10 <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 10 <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| Media | 6 | * | * | * |
| Media | 7 | * | * | * |
| Media | 8 | * | * | * |
| Media | 9 | * | * | * |
| Media | 10 | * | * | * |
| Alta | 11 | * | * | * |
| Alta | 12 | Sin aislamiento | 10 <i>Klebsiella pneumoniae</i> | * |
| Alta | 13 | * | * | * |
| Alta | 14 | * | * | * |
| Alta | 15 | 5 <i>E. coli</i> , 5 <i>Citrobacter freundii</i> | 2 <i>E. coli</i> , 8 <i>Citrobacter freundii</i> | 10 <i>Citrobacter freundii</i> |

^aGrupo control: no tratado; dosis baja (subterapéutica): 50 mg/L/d durante 12 días; dosis media (terapéutica): 100 mg/L/d durante 6 días; dosis alta (superior a la terapéutica): 200 mg/L/d durante 3 días.

* Animales en los que se obtuvieron los diez aislados de *E. coli* previstos.

4.2. SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA Y GENES QUE CODIFICAN RESISTENCIA A TETRACICLINAS

4.2.1. Estudio de la sensibilidad antimicrobiana a tetraciclinas de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales del grupo control y de los animales tratados según el momento de la toma de la muestra y la pauta de tratamiento con doxiciclina

De los 348 aislados de *E. coli* de los conejos tratados y analizados en este estudio, 311 (89,4%) fueron resistentes a doxiciclina, porcentaje similar al encontrado en los animales del grupo control (89,2%, 116 de 130). Estos porcentajes podrían derivar del uso de doxiciclina en conejos, cuyo uso está permitido desde finales de los años sesenta. En un estudio realizado por Blanc y col. (2006) en aislados de *E. coli* de animales de cría intensiva para engorde se encontró un 75,0% de aislados resistentes a tetraciclinas en granjas de conejos, un 81,2% en granjas de aves y un 84,6% en granjas de cerdos. Por otro lado, Diarra y col. (2007) encontraron un 68,5% de aislados de *E. coli* provenientes de pollos de engorde resistentes a tetraciclinas y Yang y col. (2004) detectaron una alta tasa de resistencia a tetraciclinas (98%) en aislados de *E. coli* de pollos y cerdos enfermos. Por otra parte, en diferentes estudios realizados en cepas comensales de *E. coli* aisladas de cerdos sanos también se han encontrado altos porcentajes de resistencia a tetraciclinas. Así, Lim y col. (2007) detectaron un 96,3% de aislados comensales resistentes, Enne y col. (2008) un 78,7% y van den Bogaard y Stobberingh (2000) un 100%. Estos porcentajes tan altos de resistencia se explicarían por el hecho de que las tetraciclinas han sido el grupo de antimicrobianos más comúnmente usado durante mucho tiempo en ganadería.

En el presente estudio se observaron porcentajes de aislados resistentes homogéneos en la etapa previa a la administración del tratamiento, sin diferencias estadísticamente significativas entre los valores encontrados en los aislados procedentes de los animales del grupo control y los procedentes de los conejos tratados con diferentes pautas de tratamiento. En la fase de FT se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los porcentajes de aislados resistentes a doxiciclina del grupo control con los de los grupos tratados con la dosis media ($P=0.0159$) y con la dosis alta ($P=0.0058$). Cuatro semanas después del tratamiento se observó un comportamiento similar al ocurrido en la fase de AT, no encontrándose diferencias entre el grupo control y los tratados (tabla 4.2).

En los animales control se partió de un alto porcentaje de aislados resistentes en AT (70,0%) que se incrementó en las fases de FT y PT (100,0 y 96,0%). Con la

dosis baja se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($P=0.0240$) entre las resistencias detectadas en AT y FT, mientras que con la dosis media no se encontraron diferencias significativas entre las resistencias observadas en las tres fases del ensayo, presumiblemente debido a los altos porcentajes de resistencia detectados en AT con esta pauta. Con la dosis alta se partió de un 74,3% de aislados resistentes en AT, valor que se incrementó aunque sin diferencia estadísticamente significativa en la fase de FT (81,3%), mientras que en PT se detectó un 100% de aislados resistentes a doxiciclina, porcentaje que difirió desde el punto de vista estadístico con el observado en FT ($P=0.0058$) y en AT ($P=0.0006$) (tabla 4.2). El elevado porcentaje de resistencias encontrado en los aislados provenientes de todos los animales en la fase AT podría, presumiblemente, deberse a complejos mecanismos tales como resistencia cruzada o co-resistencia, que pueden influir en el mantenimiento de resistencias a antimicrobianos en las poblaciones de *E. coli* de la microbiota intestinal (Asai y col., 2005). Asimismo, el uso de ciertos antimicrobianos en la industria cunícola puede estar influyendo en la persistencia de aislados de *E. coli* resistentes a tetraciclinas. No obstante, otros estudios serían necesarios para clarificar la posible relación entre el uso de antimicrobianos en planteles dedicados a la cría de conejos y la emergencia de resistencias.

Tabla 4.2. Resultados de la sensibilidad a doxiciclina de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales del grupo control y de los animales tratados según la pauta de tratamiento y el momento de la toma de la muestra

| Momento de la toma de la muestra | Sensibilidad antimicrobiana doxiciclina | Pauta de tratamiento con doxiciclina | | | | | | | |
|----------------------------------|---|--------------------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|------------------------|
| | | 0 mg/L (Control) | | 50 mg/L durante 12 días | | 100 mg/L durante 6 días | | 200 mg/L durante 3 días | |
| | | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| AT | Resistente | 28 | 70,0 ^a | 25 | 80,6 ^a | 44 | 88,0 ^a | 26 | 74,3 ^a |
| | Intermedia | 8 | 20,0 | 6 | 19,4 | 5 | 10,0 | 8 | 22,9 |
| | Sensible | 4 | 10,0 | 0 | 00,0 | 1 | 2,0 | 1 | 2,9 |
| FT | Resistente | 40 | 100,0 ^{a,1} | 30 | 100,0 ^{a,1} | 43 | 86,0 ^b | 26 | 81,3 ^b |
| | Intermedia | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 7 | 14,0 | 1 | 3,1 |
| | Sensible | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 5 | 15,6 |
| PT | Resistente | 48 | 96,0 ^{a, 1} | 28 | 93,3 ^a | 49 | 98,0 ^a | 40 | 100,0 ^{a 1,2} |
| | Intermedia | 1 | 2,0 | 2 | 6,7 | 1 | 2,0 | 0 | 00,0 |
| | Sensible | 1 | 2,0 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 00 | 00,0 |

Valores con la misma letra por fila no difieren significativamente por pauta de tratamiento mientras que letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa.

Valores señalados con el número 1 por columna difieren significativamente de AT y valores con el número 2 implica que existe diferencia estadísticamente significativa entre FT y PT según pauta de tratamiento. Los datos obtenidos fueron analizados por la prueba Ji-cuadrado con el test exacto de Fischer, utilizando un criterio de significación de $P < 0,05$.

De acuerdo con los resultados obtenidos y con el análisis estadístico expresado en la tabla 4.2., se evidenció una evolución similar en los porcentajes de resistencia a tetraciclina tanto en los animales del grupo control como en los tratados, partiendo de porcentajes de resistencia elevados en los cuatro grupos y que mostraron un incremento temporal en las fases sucesivas, independientemente de la dosis de doxiciclina administrada, es decir, la evolución no estuvo asociada a la pauta terapéutica (figura 4.1). Puede, pues, concluirse que en nuestro estudio no se consiguió demostrar, como cabía esperar inicialmente, que el tratamiento con doxiciclina por vía oral influyera significativamente en la generación de resistencias a tetraciclinas, y ello debido, seguramente, al alto porcentaje de aislados de *E. coli* resistentes presentes en la microbiota intestinal antes del tratamiento.

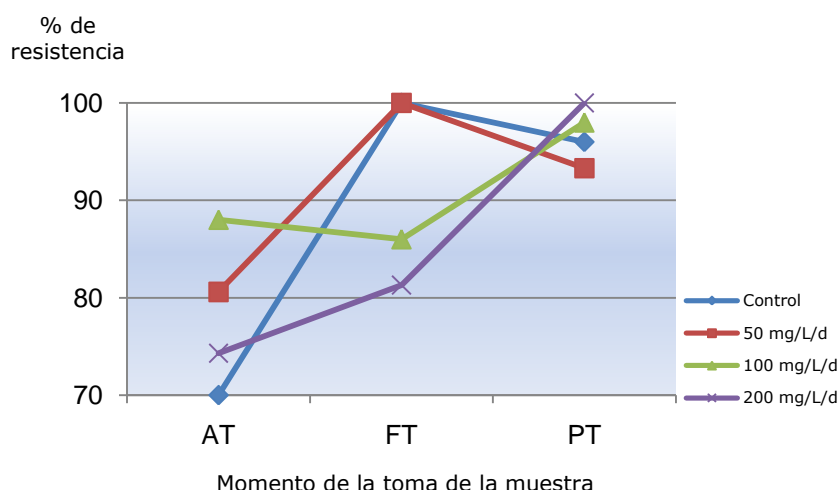


Figura 4.1. Evolución de los porcentajes de resistencia a doxiciclina según el momento de la toma de la muestra y la pauta de tratamiento

4.2.2. Detección de genes que codifican resistencia a tetraciclinas en aislados de *E. coli* de conejos

Debido al alto número de aislados resistentes a tetraciclina encontrado en este estudio (427 de los 478 investigados, un 89,3%), se decidió realizar la determinación de genes que codifican resistencia a tetraciclina en una muestra del 16,2% de estos aislados, elegida de manera aleatoria simple proporcional a cada fase del ensayo experimental, lo que supuso seleccionar 70 aislados distribuidos de la siguiente manera: 18 de los procedentes de los animales del grupo control y 52 de los provenientes de los animales tratados distribuidos en las tres fases del ensayo.

Es importante señalar que este es el primer estudio sobre caracterización de genes de resistencia a tetraciclinas en cepas de *E. coli* aisladas de conejos. Los genes que codifican resistencia a tetraciclinas incluidos en este estudio fueron *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)* y *tet(M)*. Los tres primeros están relacionados con la aparición de bombas de flujo, y *tet(A)* y *tet(B)* son los que con mayor frecuencia se han asociado con resistencia frente a tetraciclinas (Roberts, 1996; Guerra y col., 2003; Bryan y col., 2004; Fairchild y col., 2005; Diarrassouba y col., 2007). El gen *tet(M)* está relacionado con la protección de la diana ribosómica (Canton y col., 1999) y es de todos los genes *tet* de protección ribosomal conocidos el que presenta una mayor distribución, probablemente debido a su asociación con transposones de alta tasa de conjugación como Tn916 en *Streptococcus spp.* y Tn1545 en *Enterococcus spp.* (Clewell y col., 1995). Estos elementos han sido identificados en más de cincuenta géneros bacterianos diferentes, tanto gramnegativos como

grampositivos, y han jugado un papel principal en la diseminación de determinantes de resistencia de antimicrobianos entre y a través de géneros (Chopra y Roberts, 2001; Clewell y col., 1995).

4.2.2.1. Detección de genes que codifican resistencia a tetraciclinas en los aislados procedentes de los animales del grupo control

En la tabla 4.3 se muestra la frecuencia de detección de los genes *tet*-R en los aislados del grupo control según el momento de la toma de la muestra. Los genes *tet*(A) y *tet*(B) se hallaron respectivamente en 7 (38,9%) y 9 (50,0%) de los 18 aislados analizados, mientras que los genes *tet*(M) y *tet*(C) no se detectaron en ninguno de los aislados de este grupo. Costa y col. (2008) tampoco detectaron el gen *tet*(C) en un estudio llevado a cabo en 144 aislados de *E. coli* recuperados de 75 muestras fecales de perros y gatos sanos que no habían recibido tratamiento con antimicrobianos cuatro meses previos a la recogida de las muestras. Solo dos aislados de la fase PT fueron negativos a los cuatro genes estudiados (un 22,2% del total).

Tabla 4.3. Detección de los genes *tet*(A) y *tet*(B) en los aislados procedentes de los animales del grupo control resistentes a tetraciclinas seleccionados

| Genes de resistencia ^{*,**} | Momento de la toma de la muestra | | | | | | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|------|-------------|------|-------------|------|-----------------|------|
| | AT (n=3) | | FT (n=6) | | PT (n=9) | | Total (n=18) | |
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| <i>tet</i>(A) | 2 | 66,7 | 4 | 66,7 | 1 | 11,1 | 7 | 38,9 |
| <i>tet</i>(B) | 1 | 33,3 | 2 | 33,3 | 6 | 66,7 | 9 | 50,0 |

* Dos aislados en PT resultaron negativos a *tet*(A) y *tet*(B)

** Todos los aislados fueron negativos a *tet*(C) y *tet*(M)

4.2.2.2. Detección de genes que codifican resistencia a tetraciclinas en los aislados procedentes de los animales tratados

Del total de los aislados seleccionados procedentes de los animales tratados (n=52), el 100% fueron positivos al menos a uno de los genes analizados (tabla

4.4). Resultados similares han sido citados por Bryan y col. (2004), quienes detectaron que el 97% del total de las cepas de *E. coli* de personas y animales analizadas tenían al menos uno de los genes de resistencia a tetraciclinas incluidos en su estudio. En la presente investigación, el gen de resistencia predominante en los aislados resistentes a tetraciclinas fue *tet(A)* (50,0%) seguido del gen *tet(B)* (48,1%) (tabla 4.4).

Tabla 4.4. Detección de los genes *tet(A)* y *tet(B)* en los aislados procedentes de los animales tratados resistentes a tetraciclinas seleccionados

| Genes de resistencia* | Momento de la toma de la muestra | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------------------------|------|--------------|------|--------------|------|-----------------|------|
| | AT (n=9) | | FT (n=18) | | PT (n=25) | | Total (n=52) | |
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| <i>tet(A)</i> | 8 | 88,9 | 16 | 88,9 | 2 | 8,0 | 26 | 50,0 |
| <i>tet(B)</i> | 1 | 11,1 | 2 | 11,1 | 22 | 88,0 | 25 | 48,1 |
| <i>tet(A) + tet(B)</i> | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 1 | 4,0 | 1 | 1,9 |

* Todos los aislados fueron negativos a *tet(C)* y *tet(M)*

Estos resultados coinciden con los referidos por Roberts (1996) quien señala que *tet(A)* y *tet(B)* son los determinantes de resistencia a tetraciclinas más ampliamente distribuidos en la familia *Enterobacteriaceae*. Asimismo, Marti y col. (2006) señalan que los genes *tet(A)* y *tet(B)* están ampliamente diseminados entre las bacterias gramnegativas y se encuentran normalmente localizados en transposones que a su vez están insertados dentro de plásmidos, lo que les proporciona movilidad y les facilita la diseminación entre diferentes tipos de bacterias. Guerra y col. (2003) encontraron en un estudio realizado con cepas de *E. coli* resistentes a tetraciclinas procedentes de bovinos una frecuencia de detección de *tet(A)* muy similar a la de *tet(B)*, siendo estos hallazgos similares a los datos de nuestra investigación. Lanz y col. (2003) hallaron que *tet(A)* era significativamente más frecuente que *tet(B)* en aislados de *E. coli* de porcinos resistentes a tetraciclina. De manera similar refieren Sengelov y col. (2003), quienes detectaron un 71% de cepas de *E. coli* de cerdos, bovinos y aves portadoras del gen *tet(A)* y un 25% portadoras del *tet(B)*. En contraste con los resultados del presente estudio, otros investigadores han encontrado mayoritariamente el gen *tet(B)* (63%) en aislados de *E. coli* de origen humano y

animal resistentes a tetraciclinas (Bryan y col., 2004; Gow y col., 2008). Costa y col. (2008) detectaron los genes *tet(A)* y/o *tet(B)* en todas las cepas estudiadas de *E. coli* resistentes a tetraciclinas y procedentes de perros y gatos por lo que consideran que el principal mecanismo de resistencia a este antimicrobiano en los aislados de estas especies es una bomba de flujo.

Los genes *tet(C)* y *tet(M)* no se detectaron en los aislados de *E. coli* provenientes de conejos. En un estudio realizado por Diarrassouba y col. (2007) tampoco se encontró el gen *tet(C)* en cepas de *E. coli* procedentes de pollos sanos en las que sí se detectaron los genes *tet(A)* (16,2%) y *tet(B)* (32,4%). Asimismo, nuestro grupo en un estudio llevado a cabo con cepas de *E. coli* productoras de la lesión de adhesión y borrado (AEEC) aisladas de rumiantes tampoco encontró los genes *tet(C)* y *tet(M)* (Medina y col., 2011). En otro trabajo realizado con 70 cepas de *E. coli* no patógenas provenientes de productos de origen animal y de muestras fecales de personas y animales sanos no se detectó el gen *tet(C)* (Saenz y col., 2004).

Bryan y col. (2004) documentan por primera vez la presencia del gen *tet(M)* en un aislado de *E. coli* de cerdo. Tal y como sugieren DeFlaun y Levy. (1989), la presencia de *tet(M)* en *E. coli* es debido probablemente a una transferencia genética desde *Enterococcus*, un común portador de *tet(M)*. Poyart y col. (1995) apoyan lo antes mencionado ante la evidencia de la transferencia *in vitro* de Tn916 de *Enterococcus faecalis* a *E. coli*.

A pesar de que los resultados de este estudio no son fácilmente comparables con los hallazgos publicados en otros trabajos por diferir en el diseño experimental, a manera de referencia se ha querido resaltar otros datos mencionados en investigaciones previas en ciertas especies animales que señalan porcentajes de detección que van desde un 21,4% hasta un 66% para *tet(A)* en aislados de *E. coli* provenientes de pollos sanos (Guerra y col., 2003; Bryan y col., 2004; Fairchild y col., 2005; Diarrassouba y col., 2007; Smith y col., 2007) y para *tet(B)* porcentajes de detección que van desde un 30% hasta un 63% (Guerra y col., 2003; Bryan y col., 2004; Fairchild y col., 2005; Diarrassouba y col., 2007; Smith y col., 2007). Sengelov y col. (2003) encontraron un 56,7% de positividad para *tet(A)* y un 40,3% para *tet(B)* en cepas de *E. coli* aisladas de pollos enfermos y Stine y col. (2007) refirieron a su vez un 21% de positividad para *tet(B)* en aislados procedentes de cerdos sanos.

En nuestro estudio se detectó un alto porcentaje de positividad (88,9%) para *tet(A)* en los aislados de la fase AT así como en los de los controles, aunque en

estos el valor fue más bajo (66,7%). En cambio, el gen *tet(B)* se encontró en un solo aislado tanto en los animales tratados (11,1%) como en los controles (33,3%) (tablas 4.3 y 4.4). En este sentido, Blake y col. (2003) señalan que la presencia mayoritaria de uno u otro gen de resistencia a tetraciclinas podría estar relacionada con la exposición previa de los animales a antimicrobianos.

En la fase de fin de tratamiento se mantuvieron los mismos porcentajes detectados para ambos genes en AT, mientras que en PT hubo un significativo descenso porcentual de aislados portadores de *tet(A)* y un marcado aumento del gen *tet(B)*, fenómeno inverso al ocurrido en los animales del grupo control (tablas 4.3 y 4.4), lo que permite pensar que la administración oral de doxiciclina pareciera tener un efecto sobre la distribución de los genes de resistencia a tetraciclina en las poblaciones intestinales de *E. coli*. Aunque no puede descartarse, parece menos probable que este fenómeno se deba a los posibles cambios poblacionales de la bacteria relacionados con la edad de los animales (Smith y col., 2007).

Smith y col. (2007) determinaron una significativa disminución en el porcentaje de aislados comensales de *E. coli* de pollos portadores del gen *tet(B)* después de la administración oral de tetraciclina, acompañado de un incremento en el porcentaje de aislados portadores de *tet(A)*. Los mismos autores señalan que el uso en el pasado de tetraciclinas en las granjas pudo haber influido en la persistencia de un determinante particular de resistencia a tetraciclinas en el ambiente.

Un solo aislado de la fase PT (4,0%) presentó el gen *tet(A)* asociado con el gen *tet(B)*, lo que sugiere una asociación negativa entre estos genes. Los resultados de un estudio de nuestro grupo realizado con cepas de *E. coli* de rumiantes apoyan, asimismo, la idea de dicha asociación negativa (Medina y col., 2011), asociación que también ha sido observada previamente por otros investigadores que consideran que probablemente sea el resultado de incompatibilidades entre plásmidos (Méndez y col., 1980; Boerlin y col., 2005). Por otro lado, Lanz y col. (2003) y Sengelov y col. (2003) mencionan que la asociación de los genes *tet(A)* y *tet(B)* no parece ser demasiado frecuente en aislados de *E. coli* de diferentes especies animales.

Por último queremos indicar que la presencia de los genes *tet(A)* y *tet(B)* tanto en los aislados de *E. coli* de los animales control como de los tratados sugiere que la microbiota bacteriana habitual de los conejos puede desempeñar un papel importante como reservorio de genes de resistencia a este antimicrobiano, tal y como se ha planteado en investigaciones previas (Roberts, 1997; Schwarz y col., 1998; Chung y col., 1999).

4.3. SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA Y GENES QUE CODIFICAN RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS

4.3.1. Estudio de la sensibilidad antimicrobiana a betalactámicos de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales del grupo control y de los animales tratados según el momento de la toma de la muestra y la pauta de tratamiento con doxiciclina

En el presente estudio se encontró que de los 348 aislados de *E. coli* de los conejos tratados y analizados, 65 (18,7%) fueron resistentes a amoxicilina (penicilina semisintética), porcentaje superior al encontrado en los animales del grupo control (9,2%, 12 de 130). Posiblemente los relativamente bajos porcentajes de resistencia a amoxicilina en los aislados de este estudio obedezca a la contraindicación de este antimicrobiano en conejos.

Los aislados de la fase previa al tratamiento de los cuatro grupos experimentales pueden considerarse homogéneos con respecto a los porcentajes de resistencia a amoxicilina, y ello a pesar de que se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de aislados resistentes de los animales tratados con dosis baja de doxiciclina con los otros grupos (tabla 4.5). En FT solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de resistencia a doxiciclina en el grupo control y los aislados de los animales tratados con la dosis baja. En la fase de PT no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de resistencia de los aislados procedentes de los cuatro grupos experimentales (tabla 4.5).

En los animales del grupo control solo pudieron detectarse aislados resistentes a amoxicilina cuatro semanas posterior al tratamiento, mientras que en los animales tratados con la dosis baja se partió de un bajo porcentaje de resistencia a amoxicilina en AT incrementándose de manera significativa en FT y en PT. Con la dosis media se partió igualmente de una baja resistencia que se mantuvo en FT y aumentó significativamente en PT. Un comportamiento similar al del grupo control se observó con la dosis alta detectándose resistencias solamente en PT. La ausencia inicial (AT) de resistencias a amoxicilina en los animales control y en los tratados con dosis alta puede obedecer a la presencia en la microbiota intestinal de un muy bajo número de aislados resistentes y por ende no detectados en esta fase pero si hallados en PT (tabla 4.5).

En resumen, se evidenció una tendencia similar en la evolución de las resistencias frente a betalactámicos tanto en los aislados de los animales del grupo

control como en los de los animales tratados con dosis media y alta, observándose un aumento en los porcentajes de resistencia en la fase PT que no estaba asociado a la pauta terapéutica. En consecuencia, este aumento en los porcentajes de resistencia en la fase PT no estaría relacionado con el tratamiento de los animales con doxiciclina y podría deberse a los cambios poblacionales en la microbiota intestinal de *E. coli* con la edad de los animales.

Tabla 4.5. Resultados de la sensibilidad a amoxicilina de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales del grupo control y de los animales tratados según la pauta de tratamiento y el momento de la toma de la muestra

| Momento de la toma de la muestra | Sensibilidad antimicrobiana amoxicilina | Pauta de tratamiento con doxiciclina | | | | | | | |
|----------------------------------|---|--------------------------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
| | | 0 mg/L (Control) | | 50 mg/L durante 12 días | | 100 mg/L durante 6 días | | 200 mg/L durante 3 días | |
| | | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| AT | Resistente | 0 | 00,0 ^a | 4 | 12,9 ^b | 4 | 8,0 ^a | 0 | 00,0 ^a |
| | Intermedia | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 |
| | Sensible | 40 | 100,0 | 27 | 87,1 | 46 | 92,0 | 35 | 100,0 |
| FT | Resistente | 0 | 00,0 ^a | 15 | 50,0 ^{b,1} | 4 | 8,0 ^a | 0 | 00,0 ^a |
| | Intermedia | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 |
| | Sensible | 40 | 100,0 | 15 | 50,0 | 46 | 92,0 | 32 | 100,0 |
| PT | Resistente | 12 | 24,0 ^{a,1,2} | 13 | 43,3 ^{a,1} | 14 | 28,0 ^{a,1,2} | 11 | 27,5 ^{a,1,2} |
| | Intermedia | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 |
| | Sensible | 38 | 76,0 | 17 | 56,7 | 36 | 72,0 | 29 | 72,5 |

Valores con la misma letra por fila no difieren significativamente por pauta de tratamiento mientras que letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa.

Valores señalados con el número 1 por columna difieren significativamente de AT y valores con el número 2 implica que existe diferencia estadísticamente significativa entre FT y PT según pauta de tratamiento. Los datos obtenidos fueron analizados por la prueba Ji-cuadrado con el test exacto de Fischer, utilizando un criterio de significación de $P < 0,05$.

4.3.2. Detección de genes que codifican resistencia a betalactámicos en aislados de *E. coli* de conejos

La detección de genes que codifican resistencia a betalactámicos se realizó en el total de los 77 aislados resistentes a amoxicilina detectados en el estudio. Estos aislados procedían 12 de los animales del grupo control y los 65 restantes de los animales tratados con las tres pautas terapéuticas.

Los genes estudiados que codifican resistencia para esta familia de antimicrobianos y que forman parte del grupo de las llamadas β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) fueron *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M-9} (pertenecientes a la familia CTX-M-9), BLEEs mayormente detectadas en enterobacterias (Monstein y col., 2007), y *bla*_{OXA-1}.

4.3.2.1. Detección de genes que codifican resistencia a betalactámicos en los aislados procedentes de los animales del grupo control

En este grupo se detectó únicamente el gen *bla*_{TEM} en un bajo porcentaje a las cuatro semanas post tratamiento. Cabe destacar que en este grupo un 83,3% del total de aislados resultó negativo a todos los genes que confieren resistencia a betalactámicos estudiados (tabla 4.6).

Tabla 4.6. Detección del gen *bla*_{TEM} en los aislados procedentes de los animales del grupo control resistentes a betalactámicos seleccionados

| Genes de resistencia ^{*,**} | Momento de la toma de la muestra | | | | | | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|---|-------------|---|--------------|------|-----------------|------|
| | AT (n=0) | | FT (n=0) | | PT (n=12) | | Total (n=12) | |
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| <i>bla</i> _{TEM} | - | - | - | - | 2 | 16,7 | 2 | 16,7 |

* Todos los aislados fueron negativos a *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M-9} y *bla*_{OXA-1}

** 10 aislaron resultaron negativos a todos los genes estudiados

4.3.2.2. Detección de genes que codifican resistencia a betalactámicos en los aislados procedentes de los animales tratados

Un mayor porcentaje general de aislados de *E. coli* portadores del gen *bla*_{TEM} se detectó en los aislados de los animales tratados (89,2%), apoyando el hecho de que *bla*_{TEM} es la betalactamasa comúnmente encontrada en bacterias gramnegativas (Bradford, 2001). Como puede observarse en la tabla 4.7, en la fase previa a la administración del tratamiento se detectó el gen *bla*_{TEM} en el 100,0% de los aislados estudiados en esta fase y, a diferencia del grupo control, se detectó un 89,4% de aislados portadores de este gen al final del tratamiento, disminuyendo ligeramente hasta un 86,0% en PT.

Tabla 4.7. Detección de los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M-9} en los aislados procedentes de los animales tratados resistentes a betalactámicos seleccionados

| Genes de resistencia ^{*,**} | Momento de la toma de la muestra | | | | | | | |
|---|----------------------------------|-------|--------------|------|--------------|------|-----------------|------|
| | AT (n=8) | | FT (n=19) | | PT (n=38) | | Total (n=65) | |
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| <i>bla</i> _{TEM} | 8 | 100,0 | 17 | 89,4 | 33 | 86,0 | 58 | 89,2 |
| <i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M-9} | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 3 | 7,9 | 3 | 4,6 |

* Todos los aislados fueron negativos a *bla*_{SHV} y *bla*_{OXA-1}

** 4 aislaron resultaron negativos a todos los genes estudiados

El gen *bla*_{CTX-M-9} se encontró asociado a *bla*_{TEM} en tres aislados de la fase de PT (7,9%), corroborando el hecho de que las enzimas CTX-M en cepas aisladas de estos animales también se encuentran asociadas con otras betalactamasas, particularmente TEM o derivados, lo que es consistente con lo encontrado en aislados de personas (Bonnet, 2004). Estos aislados resistentes a amoxicilina y a otros antimicrobianos no betalactámicos como estreptomicina, doxiciclina y eritromicina, según los resultados del estudio de sensibilidad antimicrobiana, estaban asociados a un integrón de clase 1, en cuya región variable se detectó solamente el gen de resistencia a estreptomicina *aadA2* (resultados detallados en el apartado de resistencia mediada por integrones). En este sentido, es conocido que el integrón In60 (número de acceso del GenBank AF174129) contiene el gen *bla*_{CTX-M-9} con los genes *aadA2* y *dfrA16* (Sabate y Prats, 2002), aunque este último no fue detectado dentro de la región variable del integrón de nuestros aislados. Asimismo, nuestros aislados fueron portadores del gen *tet(B)* que codifica resistencia a tetraciclinas y de los genes *qacEΔ1* + *sul1* (resistencia a compuestos de amonio cuaternario y sulfamidas). Estos hallazgos concuerdan con el hecho de que los genes que codifican BLEEs a menudo coexisten con otros determinantes de resistencia y que pueden también estar asociados con transposones/integrones, incrementando el potencial de multirresistencia bacteriana, así como la difusión de estos determinantes de resistencia entre especies bacterianas (Li y col., 2007). Li y col. (2007) también sostienen que la coexistencia de genes de resistencia a antimicrobianos en asociación con integrones puede incrementar la selección y diseminación de bacterias multirresistentes.

Es importante resaltar que los tres aislados comensales de *E. coli* portadores de *bla*_{CTX-M-9} en este estudio pertenecían al grupo filogenético D, a pesar de que los aislados de origen comunitario, de animales, personas sanas y medio ambiente portadores de este gen pertenecen mayoritariamente a los grupos filogenéticos A y B1 (Johnson y col., 2006), lo que indica que posiblemente se trate de aislados patógenos extraintestinales presentes en el medio ambiente (Picard y col., 1999; Johnson y Stell, 2000). En estudios realizados por Weill y col. (2004) y Politi y col. (2005) se detectó el gen *bla*_{CTX-M-9} en aislados comensales de *Salmonella* de aves de granja y de origen humano.

Blanc y col. (2006) citan que en granjas de cría intensiva de conejos la familia CTX-M-9 fue la más frecuente entre los aislados de *E. coli* portadores de enzimas BLEEs, siendo detectada en tres de un total de cuatro aislados, de los cuales solo uno fue portador específicamente del gen *bla*_{CTX-M-9}. Por otro lado, estos autores encontraron que casi todos sus aislados de *E. coli* portadores de *bla*_{CTX-M-9} fueron resistentes a estreptomicina, trimetoprim y sulfametoxazol, lo cual debe estar relacionado con la selección de integrones de clase 1 que además del gen *bla*_{CTX-M-9} codifican los genes *sul1*, *dfrA16* y *aadA2* responsables de estas resistencias. Navarro y col. (2007) encontraron en personas un 6,3% de aislados clínicos de *E. coli* productores de *bla*_{CTX-M-9}.

En virtud del alto porcentaje de aislados portadores del gen *bla*_{TEM} tanto en los animales control como en los tratados, así como el bajo porcentaje de *bla*_{CTX-M-9} detectado en nuestro estudio, podría decirse que los aislados comensales de *E. coli* de la microbiota intestinal de los conejos son un reservorio de BLEEs, como también han planteado Blanc y col., (2006), quienes hallaron altos porcentajes de aislados comensales de *E. coli* provenientes de granjas de aves, cerdos y conejos portadores de BLEEs, concluyendo que estos animales pueden ser reservorios de estos genes cuya transferencia a bacterias patógenas no debería descartarse. El tratamiento de estos animales con antimicrobianos betalactámicos parece ser la base de la selección de estas resistencias antimicrobianas.

Un 6,1% del total de aislados estudiados de los animales tratados no portaban ninguno de los genes analizados. El hecho de que el gen *bla*_{OXA-1} se detecte fundamentalmente en *Pseudomonas aeruginosa* y de manera ocasional en algunos géneros de enterobacterias de interés clínico (Bradford, 2001) podría explicar la ausencia de este gen en los aislados de *E. coli* de conejos estudiados en este trabajo. No así para el caso de *bla*_{SHV} que junto con *bla*_{TEM} son las BLEEs mayormente encontradas en *E. coli* (Bradford, 2001).

A manera de referencia, en un estudio realizado en aislados de *E. coli* no patógenos obtenidos de productos alimenticios de origen animal y muestras fecales de personas y animales sanos, se detectó el gen *bla*_{TEM} en los 17 aislados estudiados, mientras que no se encontraron *bla*_{OXA-1} y *bla*_{SHV} (Saenz y col., 2004). Poeta y col. (2009) detectaron la presencia del gen *bla*_{TEM} en un 19,2% de aislados *E. coli* enteropatógenos recuperados de muestras fecales de conejos diarreicos y resistentes a ampicilina. Costa y col. (2008) citan en un estudio realizado en aislados de *E. coli* resistentes a ampicilina provenientes de animales domésticos sanos la detección del gen *bla*_{TEM} en un 71,0%, siendo el mecanismo de resistencia más frecuente en estos aislados. Este hallazgo también había sido mencionado por Briñas y col. (2002) en *E. coli* resistentes a ampicilina procedentes de productos alimenticios y muestras fecales de personas y animales sanos. En un estudio realizado por nuestro grupo de investigación en cepas de *E. coli* resistentes a ampicilina provenientes de rumiantes también encontramos que el gen *bla*_{TEM} era el mecanismo de resistencia predominante (Medina y col., 2011).

Mesa y col. (2006) determinaron una prevalencia del 20% en cepas de *E. coli* productoras de BLEEs aisladas a partir de las muestras de suelo de material fecal de granjas de conejos y, asimismo, consiguieron prevalencias del 80% y 100% en cepas de *E. coli* de granjas de cerdos y aves respectivamente, mostrando que los aislados de *E. coli* productores de BLEEs estuvieron mayormente presentes en estas granjas en comparación con las de conejos en las cuales se destacó una baja prevalencia.

4.4. SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA Y GENES QUE CODIFICAN RESISTENCIA A AMINOGLUCÓSIDOS

4.4.1. Estudio de la sensibilidad antimicrobiana a aminoglucósidos de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales del grupo control y de los animales tratados según el momento de la toma de la muestra y la pauta de tratamiento con doxiciclina

De los 348 aislados de *E. coli* de los conejos tratados, 11 (3,2%) fueron resistentes a gentamicina, mientras que en los de los animales del grupo control fueron 3 (2,3%) los aislados resistentes a este antimicrobiano. A manera de referencia, Asai y col. (2005) encontraron porcentajes de resistencia a gentamicina en aislados de *E. coli* de cerdos y pollos de engorde del 3,7 y 6,3% respectivamente, mientras que en aislados de bovinos y gallinas ponedoras no se

detectaron resistencias a este antimicrobiano. Por otro lado, Lim y col. (2007) detectaron un 2,1% y un 10,2% de resistencia a gentamicina en aislados de *E. coli* de muestras fecales de bovinos y cerdos; Enne y col. (2008) descubrieron porcentajes de resistencia del 1,0 y 0,1 en aislados comensales de *E. coli* de cerdos y bovinos respectivamente.

En este estudio se detectó en la fase previa a la administración del tratamiento un bajo porcentaje de aislados resistentes a gentamicina. En la fase de FT no se observaron aislados resistentes mientras que en PT se detectaron aislados resistentes a gentamicina tanto en los conejos del grupo control como en los animales que recibieron la dosis alta, observándose una diferencia estadísticamente significativa entre ambos valores (tabla 4.8).

En los animales del grupo control solo pudieron detectarse aislados resistentes a gentamicina en PT, mientras que en los animales tratados con la dosis baja solo se detectaron en un bajo porcentaje en AT. Con la dosis media todos los aislados de *E. coli* fueron sensibles al antimicrobiano estudiado y en el grupo tratado con la dosis alta las resistencias se encontraron solamente en PT (tabla 4.8).

De acuerdo con lo observado en este estudio, podría decirse que el aumento en el porcentaje de resistencias visto en los aislados de la fase PT de los animales tratados con dosis alta, algo que no se aprecia en el caso de los tratados con dosis baja y media, no parece estar asociado al tratamiento, pues también en el grupo control se encontró un aumento aunque menor en el porcentaje de resistencias en la fase PT.

Tabla 4.8. Resultados de la sensibilidad a gentamicina de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales del grupo control y de los animales tratados según la pauta de tratamiento y el momento de la toma de la muestra

| Momento de la toma de la | Sensibilidad antimicrobiana gentamicina | Pauta de tratamiento con doxiciclina | | | | | | | |
|--------------------------|---|--------------------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|-----------------------|
| | | 0 mg/L (Control) | | 50 mg/L durante 12 días | | 100 mg/L durante 6 días | | 200 mg/L durante 3 días | |
| | | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| AT | Resistente | 0 | 00,0 ^a | 1 | 3,2 ^a | 0 | 00,0 ^a | 0 | 00,0 ^a |
| | Intermedia | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 |
| | Sensible | 40 | 100,0 | 30 | 96,8 | 50 | 100,0 | 35 | 100,0 |
| FT | Resistente | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 |
| | Intermedia | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 |
| | Sensible | 40 | 100,0 | 30 | 100,0 | 50 | 100,0 | 32 | 100,0 |
| PT | Resistente | 3 | 6,0 ^a | 0 | 00,0 ^a | 0 | 00,0 ^a | 10 | 25,0 ^{b,1,2} |
| | Intermedia | 4 | 8,0 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 1 | 2,5 |
| | Sensible | 43 | 86,0 | 30 | 100,0 | 50 | 100,0 | 29 | 72,5 |

Valores con la misma letra por fila no difieren significativamente por pauta de tratamiento mientras que letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa.

Valores señalados con el número 1 por columna difieren significativamente de AT y valores con el número 2 implica que existe diferencia estadísticamente significativa entre FT y PT según pauta de tratamiento. Los datos obtenidos fueron analizados por la prueba Ji-cuadrado con el test exacto de Fischer, utilizando un criterio de significación de $P < 0,05$.

4.4.2. Detección de genes que codifican resistencia a aminoglucósidos en aislados de *E. coli* de conejos

En virtud de los escasos aislados resistentes a gentamicina detectados en la presente investigación, se decidió estudiar también la totalidad de aislados con sensibilidad intermedia, con lo cual se analizó un total de 19 aislados (14 resistentes y 5 intermedios).

Los genes de resistencia a los aminoglucósidos estudiados fueron *aac(3)-IIa*, *aac(3)-IVa* y *ant(2'')-Ia* que codifican una aminoglucósido N-acetiltransferasa tipo II, una aminoglucósido N-acetiltransferasa tipo IV y una aminoglucósido O-adeniltransferasa respectivamente.

4.4.2.1. Detección de genes que codifican resistencia a aminoglucósidos en los aislados procedentes de los animales del grupo control

No se detectó ninguno de los genes estudiados en los cinco aislados que conformaron este grupo y que pertenecían a la fase de post tratamiento.

4.4.2.2. Detección de genes que codifican resistencia a aminoglucósidos en los aislados procedentes de los animales tratados

En los animales tratados con doxiciclina se detectó únicamente un aislado de *E. coli* portador del gen *aac(3)-II* y otro positivo a *aac(3)-IV*, y ambos aislados eran resistentes a gentamicina, portadores de un integrón de clase 1 y pertenecían a la fase PT (tabla 4.9).

Es interesante señalar que los aislados de *E. coli* recuperados de conejos sanos en este estudio mostraron bajos porcentajes de genes de resistencia a aminoglucósidos, e inclusive fueron más bajos que los publicados anteriormente para *E. coli* procedentes de animales enfermos y en animales productores de alimentos (Normand y col., 2000; Sáenz y col., 2001; Lanz y col., 2003; Carattoli y col., 2005). Poeta y col. (2009) detectaron la presencia de los genes *aac(3)-II* y *aac(3)-IV* en un 3,8% de aislados de *E. coli* enteropatógenos resistentes a gentamicina, recuperados de conejos diarreicos. En un trabajo publicado por Sáenz y col. (2001) se detectó el gen *aac(3)-II* en uno de los cuatro aislados de *E. coli* estudiados en pollos y *aac(3)-IV* en tres aislados de *E. coli* de personas resistentes a gentamicina. Medina y col. (2011) encontraron un 80% de aislados de *E. coli* de rumiantes portadores del gen *aac(3)-IIa*.

Resulta interesante que en este estudio a pesar de no haberse detectado aislados de *E. coli* portadores del gen *ant(2'')-Ia* (*aadB*) por PCR, siendo como es el gen de resistencia a aminoglucósidos por un mecanismo de adenilación más comúnmente encontrado en bacterias gramnegativas (Shaw y col., 1993), sí pudo encontrarse por secuenciación dentro de la región variable de un integrón de clase 1 en 17 aislados multirresistentes como podrá observarse en el capítulo de estudio de integrones.

Tabla 4.9. Detección de los genes *aac(3)-IIa* y *aac(3)-IVa* en los aislados procedentes de los animales tratados resistentes a aminoglucósidos seleccionados

| Genes de resistencia ^{*,**} | Momento de la toma de la muestra | | | | | | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|------|-------------|------|--------------|-----|-----------------|-----|
| | AT (n=1) | | FT (n=0) | | PT (n=13) | | Total (n=14) | |
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| <i>aac(3)-IIa</i> | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 1 | 7,7 | 1 | 7,1 |
| <i>aac(3)-IVa</i> | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 1 | 7,7 | 1 | 7,1 |

* 12 aislados resultaron negativos a *aac(3)-IIa* y *aac(3)-IVa*

** Todos los aislados fueron negativos a *ant(2'')-Ia*

4.5. SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA Y GENES QUE CODIFICAN RESISTENCIA A MACRÓLIDOS

4.5.1. Estudio de la sensibilidad antimicrobiana a macrólidos de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales del grupo control y de los animales tratados según el momento de la toma de la muestra y la pauta de tratamiento con doxiciclina

En el presente estudio se detectaron muy altos porcentajes de resistencia a eritromicina en la fase previa a la administración del tratamiento en los cuatro grupos experimentales, siendo estos valores homogéneos entre sí y sin diferencias estadísticamente significativas. Y otro tanto ocurrió en las fases FT y PT. Tanto en los aislados de los animales control como en los de los tratados con diferentes dosis de doxiciclina se partió de resistencias elevadas que aumentaron en FT y PT pero sin diferencias estadísticamente significativas (tabla 4.10 y figura 4.2).

Los elevados porcentajes de aislados resistentes detectados en este estudio eran esperados debido al mecanismo de resistencia intrínseco de las bacterias gramnegativas como *E. coli* por impermeabilidad de la pared bacteriana al paso de los macrólidos (Sabath y col., 1968; Escolar-Jurado y col., 1998).

Tabla 4.10. Resultados de la sensibilidad a eritromicina de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales del grupo control y de los animales tratados según la pauta de tratamiento y el momento de la toma de la muestra

| Momento de la toma de la muestra | Sensibilidad antimicrobiana eritromicina | Pauta de tratamiento con doxiciclina | | | | | | | |
|----------------------------------|--|--------------------------------------|-------------------|-------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|
| | | 0 mg/L (Control) | | 50 mg/L durante 12 días | | 100 mg/L durante 6 días | | 200 mg/L durante 3 días | |
| | | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| AT | Resistente | 37 | 92,5 ^a | 26 | 83,9 ^a | 47 | 94,0 ^a | 30 | 85,7 ^a |
| | Intermedia | 3 | 7,5 | 5 | 16,1 | 3 | 6,0 | 5 | 14,3 |
| | Sensible | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 |
| FT | Resistente | 37 | 92,5 ^a | 30 | 100,0 ^a | 49 | 98,0 ^a | 23 | 71,9 ^b |
| | Intermedia | 3 | 7,5 | 0 | 00,0 | 1 | 2,0 | 9 | 28,1 |
| | Sensible | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 |
| PT | Resistente | 49 | 98,0 ^a | 27 | 90,0 ^a | 46 | 92,0 ^a | 36 | 90,0 ^a |
| | Intermedia | 1 | 2,0 | 3 | 10,0 | 4 | 8,0 | 4 | 10,0 |
| | Sensible | 0 | 0,0 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 |

Valores con la misma letra por fila no difieren significativamente por pauta de tratamiento, mientras que letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa. Los datos obtenidos fueron analizados por la prueba Ji-cuadrado con el test exacto de Fischer, utilizando un criterio de significación de $P < 0,05$.

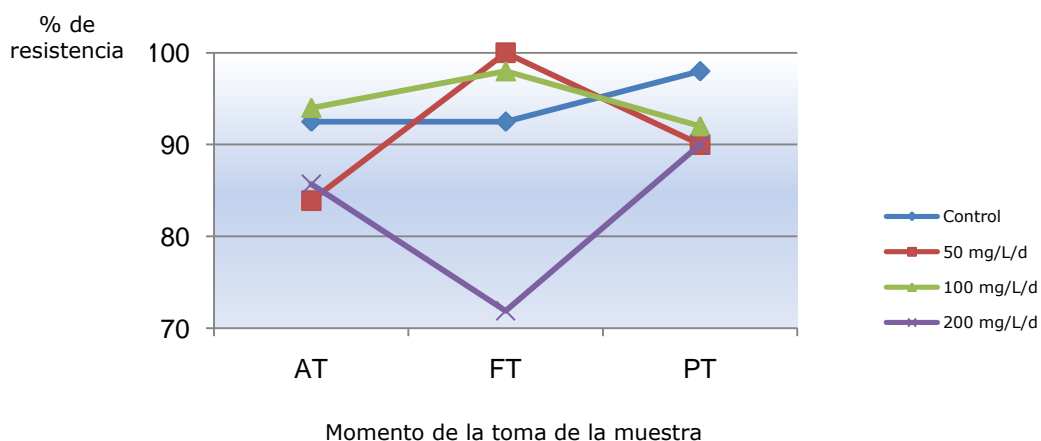


Figura 4.2. Evolución de los porcentajes de resistencia a eritromicina según el momento de la toma de la muestra y la pauta de tratamiento

4.6. SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA Y MECANISMOS DE RESISTENCIA A FLUOROQUINOLONAS

4.6.1. Estudio de la sensibilidad antimicrobiana a fluoroquinolonas de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales del grupo control y de los animales tratados según el momento de la toma de la muestra y la pauta de tratamiento con doxiciclina

En el presente estudio del total de aislados del grupo control un 7,7% (10/130) fueron resistentes a enrofloxacin y solo uno mostró sensibilidad intermedia. En los animales tratados el porcentaje de aislados de *E. coli* resistentes fue menor (2,9%, 10/348) y otros 10 aislados mostraron sensibilidad intermedia (2,9%). Lim y col. (2007) en un estudio realizado con aislados de *E. coli* de muestras fecales de bovinos y cerdos detectaron un 0,6% y 8,0% de resistencia a enrofloxacin.

En este estudio no se detectaron resistencias a enrofloxacin en las fases AT y FT en los cuatro grupos. Cuatro semanas posteriores a la administración del tratamiento se detectó un 20,0% de resistencias en los aislados el grupo control y un 25,0% en los de los animales que recibieron la dosis alta, sin diferencia estadísticamente significativa entre ambos valores (tabla 4.11).

Tabla 4.11. Resultados de la sensibilidad a enrofloxacin de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales del grupo control y de los animales tratados según la pauta de tratamiento y el momento de la toma de la muestra

| Momento de la toma de la muestra | Sensibilidad antimicrobiana enrofloxacin | Pauta de tratamiento con doxiciclina | | | | | | | |
|----------------------------------|--|--------------------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|-----------------------|
| | | 0 mg/L (Control) | | 50 mg/L durante 12 días | | 100 mg/L durante 6 días | | 200 mg/L durante 3 días | |
| | | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| AT | Resistente | 0 | 00,0 ^a | 0 | 00,0 ^a | 0 | 00,0 ^a | 0 | 00,0 ^a |
| | Intermedia | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 1 | 2,0 | 1 | 2,9 |
| | Sensible | 40 | 100,0 | 31 | 100,0 | 49 | 98,0 | 34 | 97,1 |
| FT | Resistente | 0 | 00,0 ^a | 0 | 00,0 ^a | 0 | 00,0 ^a | 0 | 00,0 ^a |
| | Intermedia | 1 | 2,5 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 1 | 3,1 |
| | Sensible | 39 | 97,5 | 30 | 100,0 | 50 | 100,0 | 31 | 96,9 |
| PT | Resistente | 10 | 20,0 ^{a,1,2} | 0 | 00,0 ^b | 0 | 00,0 ^b | 10 | 25,0 ^{a,1,2} |
| | Intermedia | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 6 | 12,0 | 1 | 2,5 |
| | Sensible | 40 | 80,0 | 30 | 100,0 | 44 | 88,0 | 29 | 72,5 |

Valores con la misma letra por fila no difieren significativamente por pauta de tratamiento mientras que letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa.

Valores señalados con el número 1 por columna difieren significativamente de AT y valores con el número 2 implica que existe diferencia estadísticamente significativa entre FT y PT según pauta de tratamiento. Los datos obtenidos fueron analizados por la prueba Ji-cuadrado con el test exacto de Fischer, utilizando un criterio de significación de $P < 0,05$.

4.6.2. Caracterización de mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas en aislados de *E. coli* de conejos

Es importante señalar que este es el primer estudio sobre caracterización de mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas en aislados de *E. coli* procedentes de conejos.

Con el fin de estudiar la resistencia a fluoroquinolonas se analizaron 31 aislados, los 20 resistentes al mencionado antimicrobiano y los 11 de sensibilidad intermedia.

Se estudiaron las mutaciones de la QRDR de los genes *gyrA* y *parC*, así como los genes que codifican resistencia a fluoroquinolonas mediada por plásmidos.

4.6.2.1. Detección de sustituciones aminoacídicas en aislados de *E. coli* de los animales del grupo control

En 8 de los 10 aislados (80,0%) se observó una doble mutación en *gyrA* (ADN-girasa) en los codones 83 (Ser83-Leu) y 87 (Asp87-Asn) y una sola mutación en *parC*, específicamente en el codón 80 (Ser80-Ile) (tabla 4.12 y figuras 4.3 y 4.4).

Tabla 4.12. Detección de sustituciones aminoacídicas de la QRDR de los genes *gyrA* y *parC* de los aislados resistentes procedentes de los animales del grupo control según el momento de la toma de la muestra

| Sustituciones aminoacídicas | | Momento de la toma de la muestra | | | |
|-------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------|--------------|------|
| <i>gyrA</i> (ADN-girasa) | <i>parC</i> (Topoisomerasa IV) | AT (n=0) | FT (n=0) | PT (n=10) | |
| | | Nº | Nº | Nº | % |
| Ser83 por Leu + Asp87 por Asn | Sin mutación | 0 | 0 | 1 | 10,0 |
| Ser83 por Leu + Asp87 por Asn | Ser80 por Ile | 0 | 0 | 8 | 80,0 |
| Ser83 por Leu + Asp87 por Asn | Ser80 por Ile + Ser50 por Phe | 0 | 0 | 1 | 10,0 |

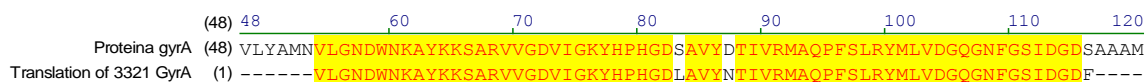


Figura 4.3. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína *gyrA* de la cepa de *E. coli* 3321, correspondiente al animal Nº 3 del grupo control y aislada en la fase PT, y la cepa de referencia NP_416734.1. Las sustituciones aminoacídicas aparecen en las posiciones 83 (Ser83 por Leu) y 87 (Asp87 por Asn)

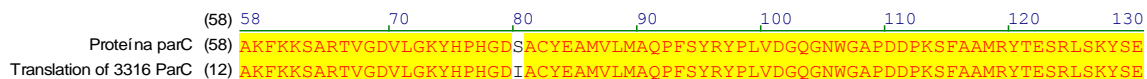


Figura 4.4. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína *parC* de la cepa de *E. coli* 3316, correspondiente al animal Nº 3 del grupo control y aislada en la fase PT, y la cepa de referencia NP_755631.1. La sustitución aminoacídica aparece en la posición 80 (Ser80 por Ile)

Varios estudios señalan que la sustitución nucleotídica en el codón 83 en el gen *gyrA* es la mutación comúnmente encontrada en aislados de *E. coli* en medicina humana y veterinaria (Vila y col., 1994; Everett y col., 1996; Heisig, 1996; Weigel y col., 1998; Vila y col., 2001; Dominguez y col., 2002; Komp Lindgren y col., 2003; Ruiz, 2003). Una mutación adicional más comúnmente encontrada en el codón Asp87 está asociada a aislados con una resistencia ligeramente superior a fluoroquinolonas (Vila y col., 1994; Lehn y col., 1996; Ozeki y col., 1997; Weigel y col., 1998; Sáenz y col., 2003). Lee y col. (2005) encontraron un 60,2 % de aislados de *E. coli* de muestras fecales de pollos con mutaciones en los codones Ser83 y Asp87 en *gyrA*. En relación a *parC*, algunos investigadores señalan que la mutación en el codón 80 es la más comúnmente encontrada en este gen en aislados de *E. coli* (Everett y col., 1996; Heisig, 1996; Chen y col., 2001; Vila y col., 2001; Dominguez y col., 2002; Komp Lindgren y col., 2003; Chaniotaki y col., 2004).

En nuestro estudio un solo aislado de la fase PT (10,0%) presentó una doble mutación en *gyrA* (Ser83 por Leu + Asp87 por Asn) pero sin mutación en *parC*, mientras que otro aislado de la misma fase mostró igualmente la doble mutación *gyrA* (Ser83 por Leu + Asp87 por Asn) y una doble mutación (Ser80 por Ile + Ser50 por Phe) en *parC* (figura 4.5), que no ha sido documentada previamente en aislados de *E. coli* y que habría que investigar si está relacionada o no con la resistencia a fluoroquinolonas. Como puede observarse, las mutaciones en *parC*

fueron encontradas junto a mutaciones en *gyrA*, como señalan Heisig (1996), Everett y col. (1996), Sáenz y col. (2003) y Komp y col. (2003).

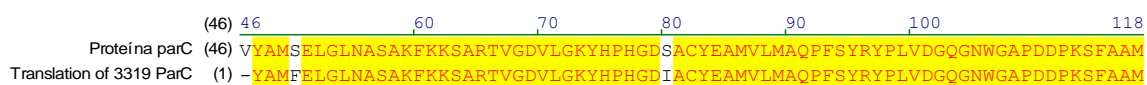


Figura 4.5. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína *parC* de la cepa de *E. coli* 3319, correspondiente al animal N° 3 del grupo control, aislada en la fase PT, y la cepa de referencia NP_755631.1. Las sustituciones aminoacídicas aparecen en las posiciones 50 (Ser50 por Phe) y 80 (Ser80 por Ile)

Dentro de los aislados de categoría intermedia solo se analizó una cepa detectada en la fase PT, no encontrándose mutaciones en las subunidades *gyrA* y *parC*.

4.6.2.2. Detección de sustituciones aminoacídicas en aislados de *E. coli* de los animales tratados

En 8 de los 10 aislados de este grupo se detectó la doble mutación Ser83 por Leu + Asp87 por Asn, 6 de estos además tenían en *parC* una doble mutación (Ser80 por Ile + Glu84 por Gly) (tabla 4.13 y figura 4.6) y otra la mutación simple Ser80 por Ile.

Tabla 4.13. Detección de sustituciones aminoacídicas de la QRDR de los genes *gyrA* y *parC* de los aislados resistentes procedentes de los animales tratados según el momento de la toma de la muestra

| Sustituciones aminoacídicas | | Momento de la toma de la muestra | | | |
|-------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------|--------------|------|
| <i>gyrA</i> (ADN-girasa) | <i>parC</i> (Topoisomerasa IV) | AT (n=0) | FT (n=0) | PT (n=10) | |
| | | Nº | Nº | Nº | % |
| Ser83 por Leu + Asp87 por Asn | Sin mutación | 0 | 0 | 1 | 10,0 |
| Ser83 por Leu + Asp87 por Asn | Ser80 por Ile + Glu84 por Gly | 0 | 0 | 6 | 60,0 |
| Ser83 por Leu + Asp87 por Asn | Ser80 por Ile | 0 | 0 | 1 | 10,0 |
| Sin mutación | Sin mutación | 0 | 0 | 2 | 20,0 |

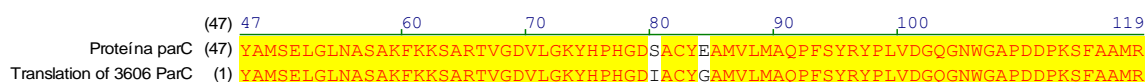


Figura 4.6. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína *parC* de la cepa de *E. coli* 3606, correspondiente al animal N° 11, tratado con la dosis alta y aislada en la fase PT, y la cepa de referencia NP_755631.1. Las sustituciones aminoacídicas aparecen en las posiciones 80 (Ser80 por Ile) y 84 (Glu84 por Gly)

El análisis de las mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* de los aislados de *E. coli* de los animales estudiados reveló que todos los aislados resistentes a fluoroquinolonas y que pertenecían a la fase de PT poseían las mutaciones típicas de estos genes publicadas en otros estudios, entre los que se pueden citar los realizados por Bagel y col. (1999) y Heisig, (1996).

Costa y col. (2008) refieren que un cambio aminoacídico en la proteína *gyrA* (Ser83-Leu o Asp87-Tyr) fue detectado en cuatro aislados resistentes a ácido nalidíxico y susceptible a ciprofloxacina y dos cambios aminoacídicos en *gyrA* (Ser83-Leu + Asp87-Asn) y uno en *parC* (Ser80-Ile) fueron identificados en un aislado ácido nalidíxico y ciprofloxacina resistente.

Yang y col. (2004) mencionan que los aislados de *E. coli* analizados en su estudio revelaron por secuenciación una sola mutación en *gyrA* (Ser83 por Leu) en todos los aislados resistentes a fluoroquinolonas y que mutaciones en *parC* junto con dobles mutaciones en *gyrA* confirieron altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas.

En los aislados con sensibilidad intermedia detectados en los animales tratados se observaron altos porcentajes de mutaciones (90,0%, 9/10) en el codón 83 (Ser83 por Leu) en el gen *gyrA* de estos aislados (tabla 4.14 y figura 4.7).

Tabla 4.14. Detección de sustituciones aminoacídicas de la QRDR de los genes *gyrA* y *parC* de los aislados intermedios procedentes de los animales tratados según el momento de la toma de la muestra

| Sustituciones aminoacídicas | | Momento de la toma de la muestra | | | | | | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------|-------------|-------|-------------|------|-----------------|------|
| <i>gyrA</i> (ADN-girasa) | <i>parC</i> (Topoisomerasa IV) | AT (n=2) | | FT (n=1) | | PT (n=7) | | Total (n=10) | |
| | | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| Ser83 por Leu | Sin mutación | 2 | 100,0 | 1 | 100,0 | 6 | 85,7 | 9 | 90,0 |
| Sin mutación | Sin mutación | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 1 | 14,3 | 1 | 10,0 |

(48) 48 60 70 80 90 100 110 120
 Proteína gyrA (48) VLYAMNVLGNDWNKAYKKSARVVGDVIGKYHPHGLSAVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSIDGDSAAAM
 Translation of 2626 GyrA (1) -----VLGNDWNKAYKKSARVVGDVIGKYHPHGLSAVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSIDGDF----

Figura 4.7. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína *gyrA* de la cepa de *E. coli* 2626, correspondiente al animal Nº 9, tratado con la dosis media y aislada en la fase AT, y la cepa de referencia NP_416734.1. La sustitución aminoacídica aparece en la posición 83 (Ser83 por Leu).

En estudios previos se menciona que aislados con una sola mutación en el codón Ser83 fueron significativamente más resistente a fluoroquinolonas que aquellos con una sola mutación en el codón Asp87. Lee y col. (2005) refieren que con algunas excepciones, aislados fecales de *E. coli* con una sola mutación en Ser83 de *gyrA*, estuvieron asociados con muy bajos niveles de resistencia a fluoroquinolonas, coincidiendo con el bajo nivel de resistencia a enrofloxacin (2,9%) exhibido por los aislados de sensibilidad intermedia que mostraron esta mutación en los aislados de este estudio. En 2 (14,3%) del total de aislados no se evidenciaron mutaciones tanto en *gyrA* como en *parC* (tabla 4.14).

4.6.2.3. Detección de genes que codifican resistencia a fluoroquinolonas mediada por plásmidos

Los genes estudiados y que están involucrados en la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos fueron las variantes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* del gen *qnr*, localizadas en un plásmido con un amplio rango de hospedador transmisible por conjugación en bacterias como *E. coli* (Martinez-Martinez y col., 1998), el gen

aac(6')/lb que codifica una enzima que inactiva el antimicrobiano y es responsable de la resistencia a kanamicina, tobramicina y amikacina y el gen *qepA* cuyo mecanismo de resistencia está asociado a una bomba de flujo o de expulsión activa.

Todos los aislados fueron negativos a los genes *qnr* estudiados, lo que coincide con el hecho de que en la actualidad la presencia de aislados portadores de estos genes ocurre relativamente con poca frecuencia en bacterias gramnegativas (Jacoby y col., 2003; Hopkins y col., 2005).

Otros estudios no han detectado genes *qnr* en *E. coli*, sin embargo, han sido detectados en aislados de *Klebsiella pneumoniae* (Rodríguez-Martínez y col., 2003; Wang y col., 2004). En un estudio realizado por Cavaco y col. (2008) no se encontraron aislados portadores de genes *qnr* ni *aac* en aislados comensales de *E. coli* provenientes de cerdo sanos, coincidiendo con nuestro hallazgos. Jurado y col. (2008) no detectaron la presencia del gen *qnrA* en aislados de *E. coli* de rumiantes y Sandvang y Aarestrup (2000) tampoco encontraron el gen *aac(6')/lb* en ninguno de los aislados de *E. coli* de bovinos y cerdos resistentes a gentamicina incluidos en su estudio.

La no identificación de genes *qnr* en este estudio podría indicar que estos genes no cumplen un papel importante en la selección de aislados resistentes a fluoroquinolonas en conejos.

El gen *qepA* no se detectó en ninguno de los aislados comensales de *E. coli* de este estudio. Sin embargo, estudios previos han revelado la detección de este gen en enterobacterias aisladas de animales de compañía y animales productores de alimentos (Chen y col., 2007; Ma y col., 2009). Este gen ha sido detectado con una baja frecuencia en aislados clínicos en personas. En este sentido, Kim y col. (2009a) mencionan que el gen *qepA* fue detectado solo en 4 (0,6%) de 621 aislados clínicos de *E. coli* y Baudry y col. (2009) encontraron este gen en un solo aislado de *E. coli* de 18 analizados (5,6%) procedentes de pacientes hospitalizados.

4.7. SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS POLIPEPTÍDICOS DE LOS AISLADOS DE *E. coli*

En el caso de la colistina o polimixina E, el 100% de los aislados procedentes de los animales del grupo control y de los animales tratados fueron sensibles a este antimicrobiano, siendo estos resultados los esperados dado el espectro de actividad antibacteriana (rápido efecto bactericida) de esta droga contra bacilos

gramnegativos como *E. coli* (Li y col., 2005; Kwa y col., 2008). La colistina es un antimicrobiano permitido en conejos desde los años setenta, sin embargo, su uso ha estado limitado en las últimas décadas (Molina y col., 2009).

Nuestros hallazgos concuerdan con los publicados por Asai y col. (2005) quienes determinaron que el 100% de los aislados de *E. coli* provenientes de bovinos, cerdos, pollos de engorde y gallinas ponedoras fueron sensibles a colistina. Por otra parte, Enne y col. (2008) no encontraron resistencia a colistina en los aislados comensales de *E. coli* de ovejas sanas.

Sin embargo, este antimicrobiano ha sido incluido en este estudio ya que forma parte de un proyecto en el que se pretendió analizar el riesgo de generación de resistencias *in vivo* a diferentes antimicrobianos en bacterias intestinales (*Escherichia coli*, *Enterococcus spp.* y *Salmonella spp.*) de animales de producción, alojados en ambiente controlado y tratados por vía oral con diferentes pautas terapéuticas.

Por lo anteriormente expuesto, a partir de este punto no se hará ningún comentario relacionado con este antimicrobiano por considerarse de poca relevancia en esta investigación.

4.8. EVOLUCIÓN DE LOS PORCENTAJES DE RESISTENCIA FRENTE A LOS DIFERENTES ANTIMICROBIANOS A LO LARGO DE LAS TRES ETAPAS DEL ENSAYO EXPERIMENTAL

Para finalizar con el análisis de la sensibilidad de los aislados a los antimicrobianos estudiados, a continuación se resume la evolución conjunta de los porcentajes de resistencia frente a los diferentes antimicrobianos en los cuatro grupos experimentales y a lo largo de las tres fases del ensayo (figuras 4.8 a 4.11).

La evolución de los porcentajes de resistencia de los cinco antimicrobianos estudiados en los animales del grupo control se muestran en la figura 4.8, observándose altos porcentajes de resistencia a doxiciclina en las tres fases, con un aumento estadísticamente significativo en FT y PT con respecto a la etapa previa a la administración del tratamiento. En el caso de eritromicina se observan altos porcentajes de aislados resistentes en las 3 fases y en el caso concreto de gentamicina, amoxicilina y enrofloxacin las resistencias solo fueron detectadas cuatro semanas posterior al tratamiento.

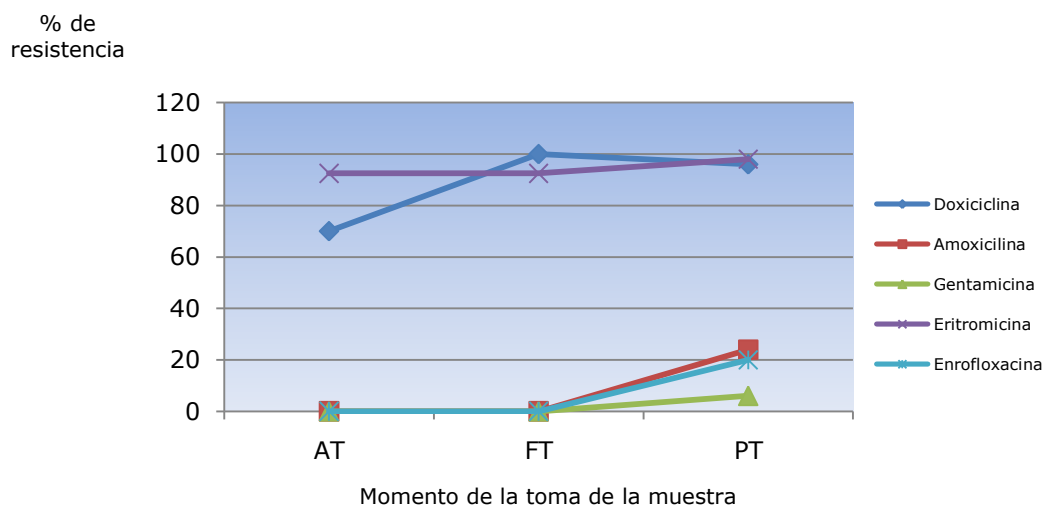


Figura 4.8. Evolución de los porcentajes de resistencia a los diferentes antimicrobianos a lo largo de las tres etapas en los animales del grupo control

Con la dosis baja (50 mg/L) de doxiciclina, se observó que al finalizar el tratamiento se produce un aumento significativo en los porcentajes de resistencia a doxiciclina y amoxicilina y aunque también se observó un aumento en los porcentajes de resistencia a eritromicina, éste no fue estadísticamente significativo. Los porcentajes de resistencia disminuyeron cuatro semanas posteriores a la administración oral de doxiciclina a niveles similares a los de partida para el caso de doxiciclina y eritromicina (figura 4.9).

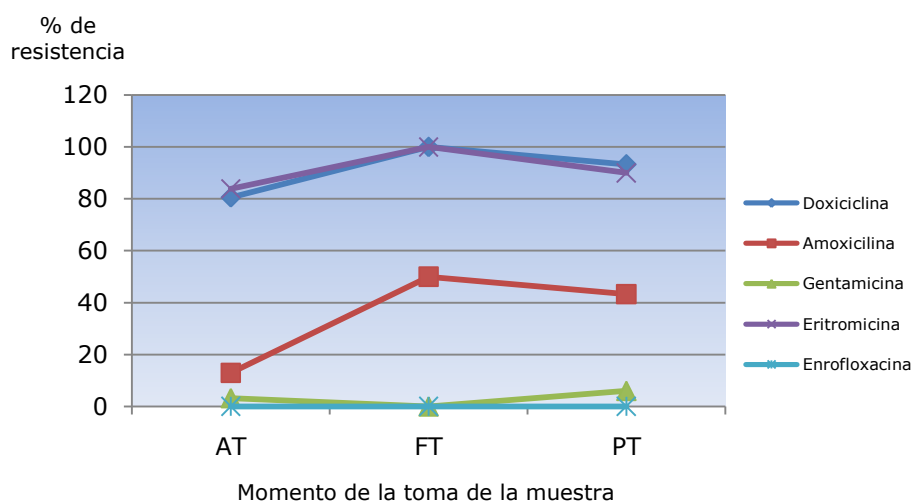


Figura 4.9. Evolución de los porcentajes de resistencia a los diferentes antimicrobianos a lo largo de las tres etapas en el grupo de los animales tratados con 50 mg/L de doxiciclina

Con la dosis media (100 mg/L) de doxiciclina se observó un incremento estadísticamente significativo en los porcentajes de resistencia a doxiciclina y amoxicilina cuatro semanas posterior a la administración del tratamiento en comparación con los valores detectados en AT (figura 4.10).

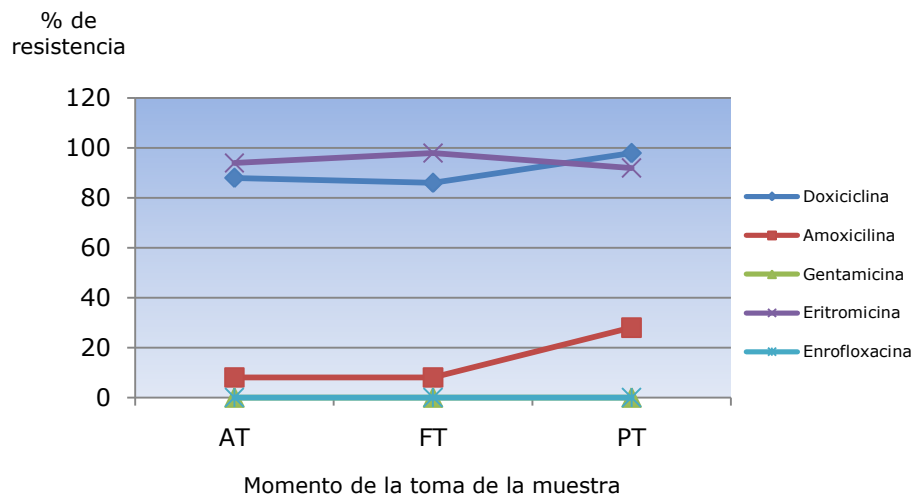


Figura 4.10. Evolución de los porcentajes de resistencia a los diferentes antimicrobianos a lo largo de las tres etapas en el grupo de los animales tratados con 100 mg/L de doxiciclina

Finalmente, con la dosis alta (200 mg/L) se observó un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de resistencia a doxiciclina en PT. El porcentaje de resistencia a eritromicina descendió al finalizar el tratamiento, experimentando un incremento significativo en PT en comparación con FT. En el caso de amoxicilina, gentamicina y enrofloxacina, se evidenció un incremento significativo cuatro semanas posterior a la administración del tratamiento tomando en cuenta que en AT no se detectaron resistencias a ninguno de estos antimicrobianos (figura 4.11).

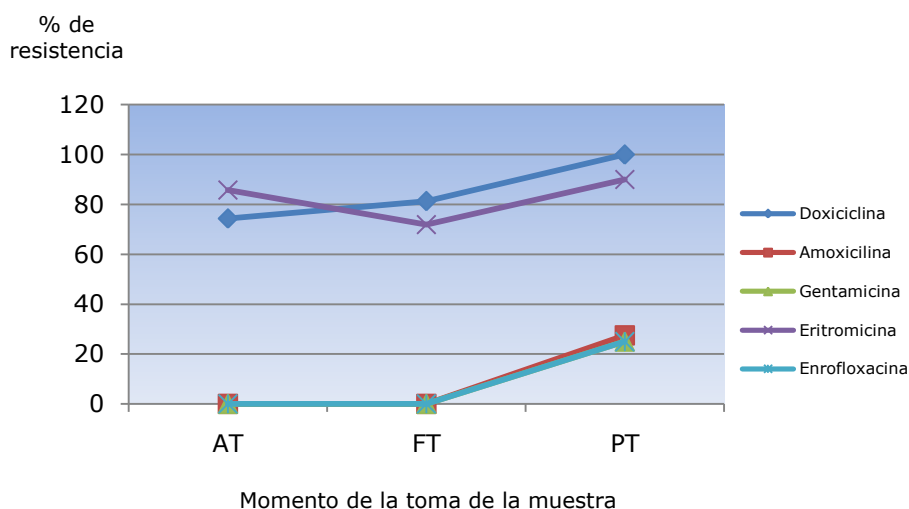


Figura 4.11. Evolución de los porcentajes de resistencia a los diferentes antimicrobianos a lo largo de las tres etapas en el grupo de los animales tratados con 200 mg/L de doxiciclina

Al hacer un análisis en conjunto podemos concluir que el tratamiento con la dosis alta de doxiciclina se asoció con un aumento significativo de las resistencias a distintos antimicrobianos heterólogos en la fase PT, siendo difícil encontrar una posible explicación a este fenómeno.

4.9. ESTUDIO DE LOS FENOTIPOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Los fenotipos de resistencia exhibidos por los 130 aislados de *E. coli* del grupo control se muestran en la tabla 4.15. Estos aislados se distribuyeron en 6 resistotipos diferentes que comprenden desde resistencia a un solo antimicrobiano hasta resistencia simultánea a cinco antimicrobianos. El fenotipo mayormente detectado tanto en la fase previa a la administración oral de doxiciclina (65,0%) como al final del tratamiento y cuatro semanas posterior al mismo (92,5 y 70,0%) fue el perfil birresistente: doxiciclina-eritromicina (DOX- ERI). El segundo resistotipo más frecuente varió según la fase del ensayo, siendo la resistencia a eritromicina (ERI) el mayormente observado en AT, resistencia a doxiciclina (DOX) en FT y resistencia a doxiciclina, amoxicilina, eritromicina y enrofloxacina (DOX-AMX-ERI-ENR) en PT. Un 24% de los aislados de PT mostraron resistencia a tres o más de los antimicrobianos estudiados. Los aislados monorresistentes fueron con una mayor frecuencia resistentes a eritromicina, mostrando un porcentaje global de

10,0% correspondiente a 13 aislados en su mayoría pertenecientes a la fase previa de la administración del tratamiento (tabla 4.15).

Tabla 4.15. Fenotipos de resistencia antimicrobiana de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales del grupo control según el momento de la toma de la muestra

| Fenotipos de resistencia | Momento de la toma de la muestra para el aislamiento | | | | | |
|--------------------------|--|------|--------------|------|--------------|------|
| | AT (n=40) | | FT (n=40) | | PT (n=50) | |
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| ERI | 11 | 27,5 | 0 | 00,0 | 2 | 4,0 |
| DOX | 2 | 5,0 | 3 | 7,5 | 1 | 2,0 |
| DOX-ERI | 26 | 65,0 | 37 | 92,5 | 35 | 70,0 |
| DOX-AMX-ERI | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 2 | 4,0 |
| DOX-AMX-ERI-ENR | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 7 | 14,0 |
| DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 3 | 6,0 |
| Sin resistencia | 1 | 2,5 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 |

DOX: doxiciclina, AMX: amoxicilina, GEN: gentamicina, ERI: eritromicina, ENR: enrofloxacin

En la tabla 4.16 se recogen los fenotipos de resistencia mostrados por los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados. Se observaron 10 fenotipos diferentes, siendo la resistencia a doxiciclina-eritromicina (DOX-ERI) el fenotipo encontrado con mayor frecuencia en las tres fases del ensayo. Sin embargo, y a pesar de que la frecuencia de detección de este fenotipo en la fase previa a la administración de doxiciclina fue más alta que en los aislados procedentes de los animales controles (69,5 vs 65,0%), no se vio un claro aumento en FT como sí ocurrió en los animales del grupo control. El segundo resistotipo más frecuente detectado en los aislados en AT, al igual que en los animales control, fue la resistencia a eritromicina (ERI), mientras que en FT y PT estuvo representado por la resistencia a doxiciclina, amoxicilina y eritromicina (DOX-AMX-ERI).

La resistencia a tres o más antimicrobianos estuvo presente en aislados de las tres fases del ensayo, a diferencia de los aislados del grupo control que mostraron multirresistencia únicamente en la fase PT. Los aislados monorresistentes fueron mayormente resistentes a eritromicina al igual que en el grupo control aunque mostraron un porcentaje global menor (6,6%, 23/348) y la mayoría de los aislados pertenecieron igualmente a AT (tabla 4.16).

Tabla 4.16. Fenotipos de resistencia antimicrobiana de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados según el momento de la toma de la muestra

| Fenotipos de resistencia | Momento de la toma de la muestra para el aislamiento | | | | | |
|--------------------------|--|------|---------------|------|---------------|------|
| | AT (n=116) | | FT (n=112) | | PT (n=120) | |
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| ERI | 13 | 11,2 | 7 | 6,3 | 3 | 2,5 |
| DOX | 6 | 5,1 | 4 | 3,6 | 9 | 7,5 |
| AMX-ERI | 1 | 0,9 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 |
| DOX-AMX | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 2 | 1,7 |
| DOX-ERI | 81 | 69,8 | 76 | 67,8 | 70 | 58,3 |
| DOX-AMX-ERI | 7 | 6,0 | 19 | 16,9 | 25 | 20,8 |
| DOX-GEN-ERI | 1 | 0,9 | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 |
| DOX-AMX-GEN-ERI | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 1 | 0,8 |
| DOX-AMX-ERI-ENRO | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 1 | 0,8 |
| DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | 0 | 00,0 | 0 | 00,0 | 9 | 7,5 |
| Sin resistencia | 7 | 6,0 | 6 | 5,4 | 0 | 00,0 |

DOX: doxiciclina, AMX: amoxicilina, GEN: gentamicina, ERI: eritromicina, ENR: enrofloxacin

Al hacer la comparación de los perfiles entre los aislados del grupo control y los tratados, podemos destacar que en ambos grupos el perfil birresistente doxiciclina-eritromicina (DOX-ERI) fue el más común aunque el porcentaje global de este resistotipo fue mayor en el grupo control en comparación con los tratados (75,3% vs. 65,2%). Los aislados monorresistentes a eritromicina exhibieron una frecuencia de 10,0% en los controles y 6,6% en los tratados, mientras que la resistencia a doxiciclina fue de 4,6% y 5,5% en cada grupo. El resistotipo DOX-AMX-GEN-ERI-ENR se encontró con una frecuencia similar entre los aislados procedentes de los controles y de los provenientes de los tratados (6,0% vs. 7,5%), detectándose el mencionado resistotipo únicamente en PT.

Capítulo 2

Estudio de perfiles REP y de relaciones clonales

4.10. ESTUDIO DE LOS PERFILES REP Y DE LAS RELACIONES CLONALES ENTRE LOS AISLADOS DE *E. coli* DE CONEJOS TRATADOS CON DIFERENTES PAUTAS DE DOXICICLINA

Las posibles relaciones clonales entre los 478 aislados de *E. coli* incluidos en este estudio se analizó mediante la técnica de REP-PCR o PCR de secuencias palindrómicas repetitivas. El grado de similitud de los perfiles genotípicos obtenidos se determinó con el programa GelCompar® II utilizando el coeficiente de correlación de Dice y UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) o método del promedio entre grupos y estableciendo un índice de tolerancia y de optimización del 5%. Se consideraron miembros de un mismo clon aquellos aislados cuyos perfiles genotípicos compartieran una similitud igual o superior al 95%.

En la figura 4.12 se muestra un ejemplo de amplificación por REP-PCR a través de electroforesis en gel de agarosa.

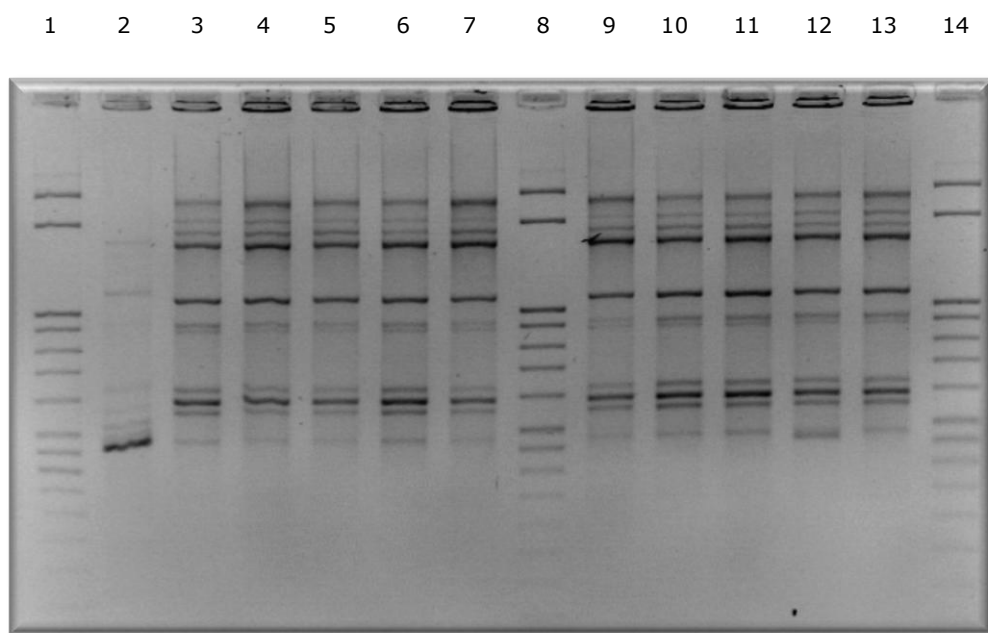


Figura 4.12. Imagen de los productos obtenidos por amplificación por REP-PCR separados electroforéticamente en gel de agarosa al 2%. Carriles 1, 8 y 14: Marcador de peso molecular *Step Ladder* (50 bp); los carriles del 3 al 7 y del 9 al 13 muestran un patrón de amplificación idéntico entre los diez aislados del animal 9 en la fase previa a la administración del tratamiento con doxiciclina (AT).

4.10.1. Análisis de perfiles REP y su asociación con grupos filogenéticos y fenotipos de resistencia de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales del grupo control

Dentro de este grupo se incluyeron los animales número 1, 2, 3, 4 y 5. De los animales 1 y 3 solo se aislaron *E. coli* en dos de las fases experimentales: FT y PT en el caso del animal 1 y en AT y PT en el animal 3, por lo que no se incluyeron en el análisis. Como puede apreciarse en la figura 4.13A, correspondiente al dendograma de los aislados procedentes del animal 2, se identificaron tres grupos clonales, uno por cada fase del ensayo. Los aislados de AT y PT se agruparon en dos clones estrechamente relacionados con una homología cercana al 93% e inclusive todos pertenecieron al mismo grupo filogenético. Asimismo, se observó que en los clones encontrados en FT y en PT predominaba un resistotipo (DOX-ERI), no así en el clon detectado en AT.

En el animal 4 (figura 4.13B) se pudo apreciar un comportamiento heterogéneo en cuanto a los perfiles de amplificación de los aislados en las tres fases, observándose nueve grupos clonales, de los cuales cinco se detectaron en AT con un resistotipo y filogrupo predominante. En FT se apreciaron dos clones con el mismo fenotipo de resistencia pero con variaciones en cuanto al grupo filogenético al cual pertenecían. En PT nueve de los diez aislados estuvieron agrupados en un mismo clon, compartiendo el mismo fenotipo de resistencia y el mismo grupo filogenético, y el otro aislado se consideró como un clon diferente.

En el animal 5 (figura 4.13C) también se observó un comportamiento heterogéneo, evidenciándose siete grupos entre los aislados de las tres fases. En la fase previa a la administración del tratamiento se hallaron cuatro clones, en tres de ellos los aislados mostraron el mismo fenotipo de resistencia (DOX-ERI) y el mismo grupo filogenético según el clon al que pertenecían, y el otro clon compartía el genotipo con un aislado de la fase de fin de tratamiento con un resistotipo diferente. En FT se apreciaron tres clones, dos de ellos con el mismo fenotipo de resistencia (DOX-ERI) y grupo filogenético, a excepción de un solo aislado. Un solo clon agrupó los diez aislados en PT pero diferían en cuanto al perfil fenotípico y grupo filogenético. Bibbal y col. (2009) señalan, en un estudio realizado en aislados fecales de *E. coli* provenientes de cerdos, que al hacer la comparación de genotipos PFGE (electroforesis en gel en campo pulsado) con grupos filogenéticos, un perfil de PFGE puede estar asociado con diferentes grupos filogenéticos.

Al analizar los dendogramas de los aislados procedentes de los animales estudiados en el grupo control se aprecia que los aislados incluidos en un grupo clonal idéntico con respecto a los perfiles REP y grupo filogenético mostraron en

algunos casos fenotipos de resistencia diferentes, fenómeno observado en la fase AT, y contrariamente, aunque con una menor frecuencia, se observaron aislados pertenecientes a un mismo clon y con el mismo resistotipo pero que pertenecían a grupos filogenéticos diferentes. Esta tendencia ocurrió en la fase de FT en los animales 4 y 5. El hecho de que un mismo fenotipo de resistencia estuviera asociado con diferentes genotipos presentes en los aislados del mismo animal o, a la inversa, que un mismo genotipo se asociara con diferentes fenotipos podría indicar la posible transferencia horizontal de determinantes de resistencia entre bacterias de *E. coli* que forman parte de la microbiota intestinal de los gazapos como sugieren Bibbal y col. (2009).

Los resultados de este estudio constatan que existe una gran variabilidad genética entre los aislados procedentes de los animales del grupo control. Asimismo, los grupos clonales encontrados en los aislados de estos animales no incluyeron aislados de diferentes etapas, lo cual indicaría que entre las diferentes etapas en que se dividió el ensayo experimental se produjo un cambio en las poblaciones de *E. coli* predominantes en el medio intestinal de los conejos. Las variaciones observadas podrían ser dependientes de la edad de los animales como explican Pérez de Rozas y col. (2003) en un estudio realizado en gazapos de diferentes edades que no recibieron tratamiento con antimicrobianos y en el que se encontraron cambios en los perfiles de RFLP (*Restriction Fragment Length polymorphism*) en función de la edad.

Resultados y Discusión

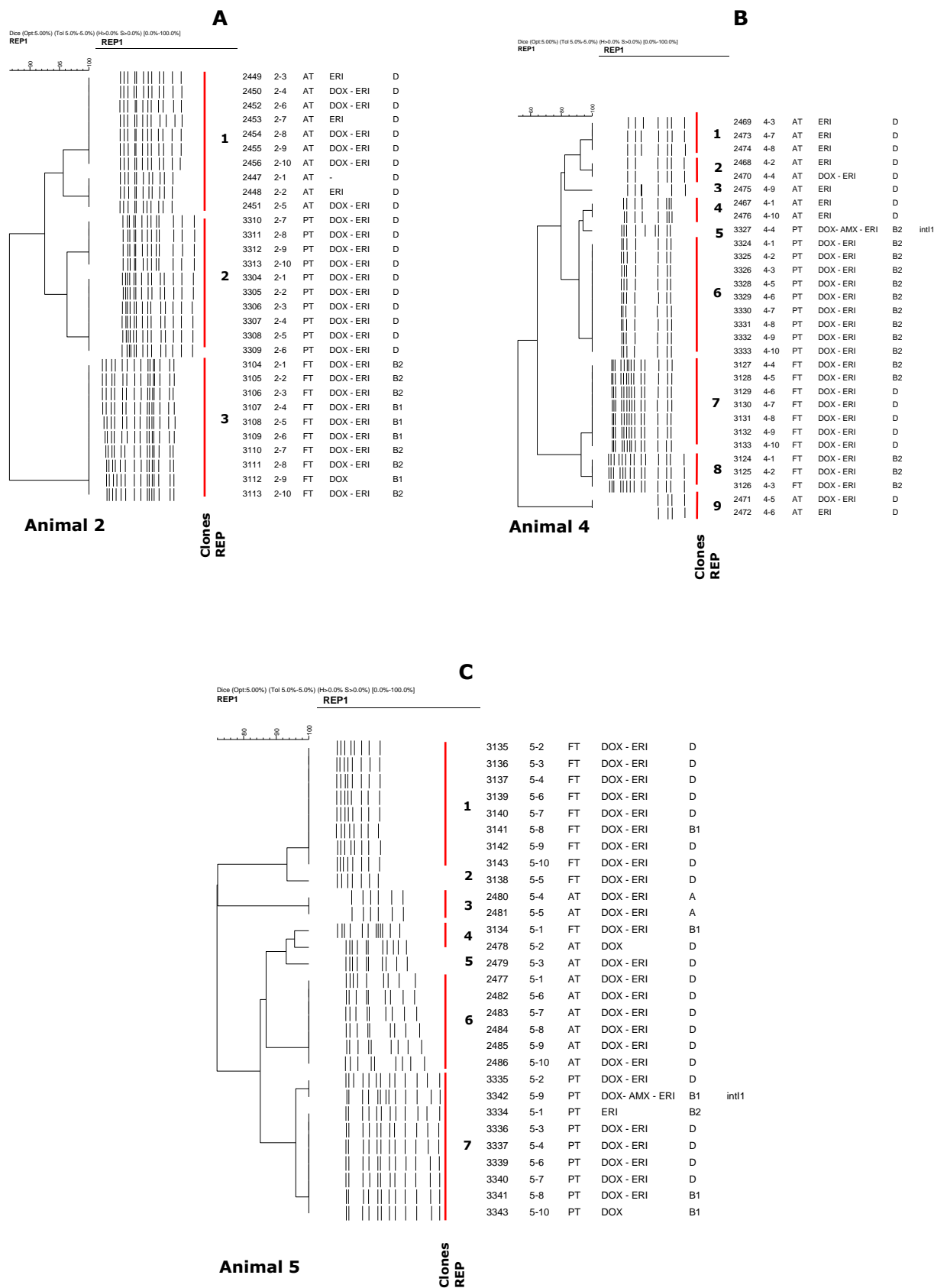


Figura 4.13. Similitud genética entre los aislados de *E. coli* de los animales del grupo control (animales 2, 4 y 5). Los dendogramas fueron generados a partir del algoritmo de medias aritméticas de UPGMA para los aislados de cada animal en las tres fases del ensayo.

4.10.2. Análisis de perfiles REP y su asociación con grupos filogenéticos y fenotipos de resistencia de los aislados de *E. coli* procedentes de los animales tratados

4.10.2.1. Aislados de los animales tratados con 50 mg/L/d de doxiciclina

En este grupo se incluyeron los animales número 16, 17, 18, 19 y 20. Del animal 16 solo se obtuvo un aislado de *E. coli* mientras que del animal 20 se aislaron otras bacterias distintas de *E. coli*, por lo que no se incluyeron en el análisis. En general se observó con la dosis baja de doxiciclina (50 mg/L/d) una marcada variabilidad clonal en los aislados de los animales de este grupo. En el dendograma de los aislados procedentes del animal 17 (figura 4.14A) se encontraron 6 grupos clonales distintos. Los aislados de AT se repartieron en dos clones, uno de los cuales estuvo conformado únicamente por aislados de AT, con el mismo fenotipo de resistencia (DOX-ERI) y filogrupo, y el otro incluyó aislados de AT y PT con distinto resistotipo. En FT se encontraron dos clones con diferente fenotipo y uno de ellos compartió 3 aislados de esta fase con 2 de PT. Algunos de los aislados de PT conformaron un mismo grupo clonal con idéntico resistotipo (DOX-ERI) y grupo filogenético y otros compartieron el mismo genotipo con aislados de AT con diferente fenotipo de resistencia.

En los aislados del animal 18 (figura 4.14B) se detectaron 8 grupos clonales. De los 5 clones hallados en AT, tres compartieron un mismo genotipo con aislados de PT y en uno de éstos el genotipo estuvo asociado a un mismo fenotipo de resistencia (DOX-AMX-ERI), mientras que los aislados de FT estuvieron integrados en un clon mayoritario con idéntico fenotipo. En PT la mayoría de los aislados conformaron clones conjuntamente con aislados de la fase inicial.

En los aislados del animal 19 se identificaron 9 clones. Los aislados de AT se repartieron en 4 clones con diferentes perfiles de resistencia y uno de ellos agrupó conjuntamente un aislado de esta fase con uno de FT. En FT se observaron dos clones conformados por aislados de *E. coli* procedentes de esta etapa con un mismo fenotipo de resistencia. Dos clones en PT agruparon los aislados restantes de esta fase y estuvieron asociados a diferentes resistotipos (figura 4.14C).

En base a este análisis podemos concluir que entre los aislados de los animales de este grupo de tratamiento se encontraron genotipos que incluyeron aislados de diferentes etapas, observándose con frecuencia que en un mismo genotipo se incluían aislados de las fases AT y PT pero no de AT y FT, lo cual parece indicar que se produjo un cambio en las poblaciones predominantes de *E. coli* entre la etapa

inicial y final del tratamiento. Y es posible que alguno de los genotipos detectados inicialmente permaneciera de forma minoritaria (y por eso no se detectara) en el medio intestinal durante el tratamiento con doxiciclina y que, una vez finalizado este, volvieran a expandirse.

En cuanto a la relación entre los genotipos encontrados y los fenotipos de resistencia, se observó que en algunos de los genotipos detectados predominaba un fenotipo de resistencia y, asimismo, pudo constatarse la presencia de diferentes fenotipos dentro de un mismo genotipo en los aislados de *E. coli* de un mismo animal, pudiendo esto deberse a la posible transferencia horizontal entre bacterias de genes de resistencia o a la captación de determinantes genéticos de resistencia lo que podría garantizar el éxito adaptativo y la resultante selección de clones como se sugiere en otros estudios (Robinson y col., 2005; Turner y col., 2006; McBride y col., 2007).

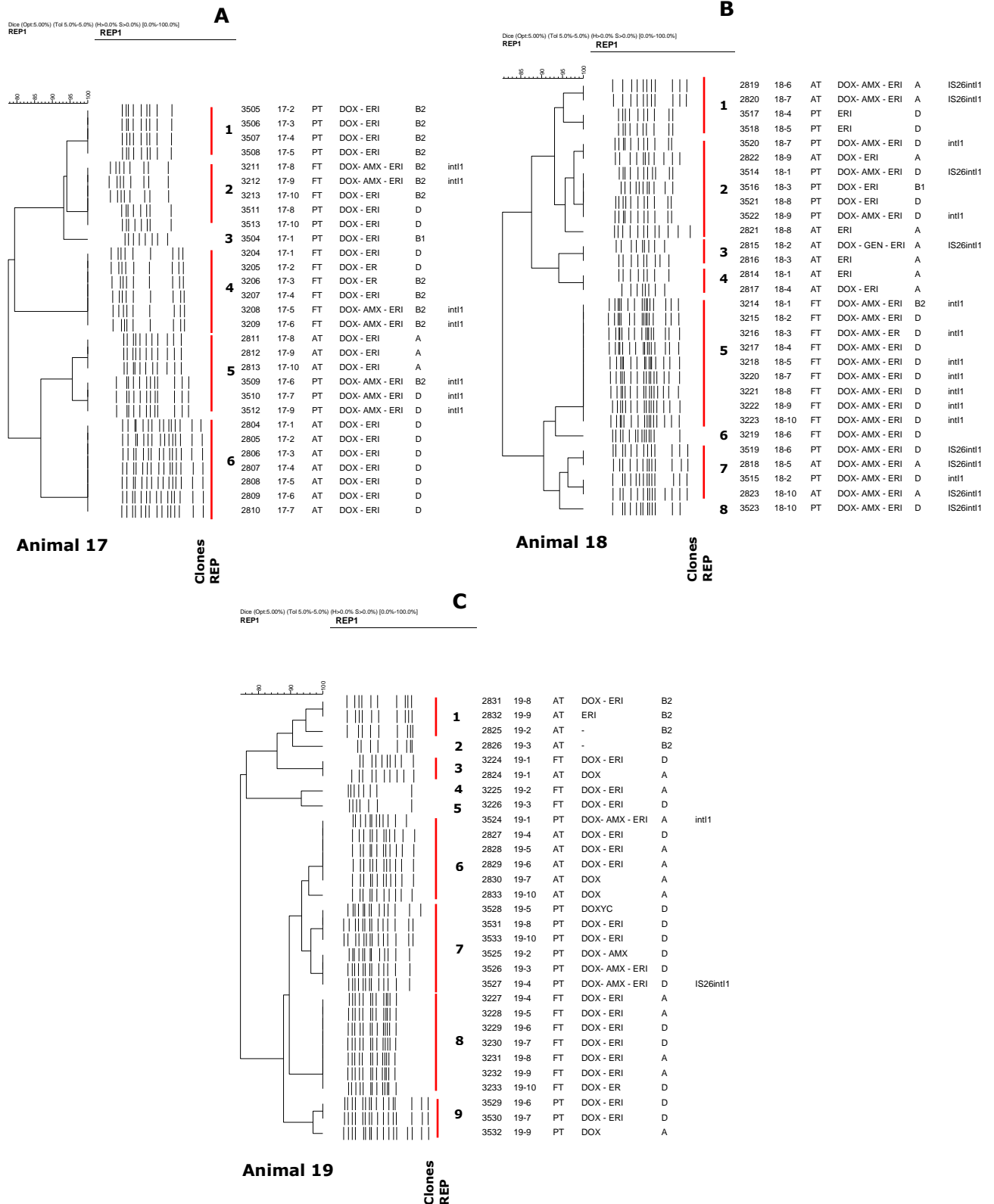


Figura 4.14. Similitud genética entre los aislados de *E. coli* de los animales tratados con 50 mg/L/d de doxiciclina (animales 17, 18 y 19). Los dendogramas fueron generados a partir del algoritmo de medias aritméticas de UPGMA para los aislados de cada animal en las tres fases del ensayo.

4.10.2.2. Aislados de los animales tratados con 100 mg/L/d de doxiciclina

En este grupo de tratamiento se incluyeron los animales número 6, 7, 8, 9 y 10. En los animales tratados con esta dosis pareciera existir un aumento de la homogeneidad de los perfiles genotípicos de los aislados en las tres fases, es decir, que la mayoría de los clones incluyen aislados de una misma fase. En el animal 6 (figura 4.15A) se detectaron cinco clones, y solo uno de ellos incluía aislados de dos fases (AT y FT).

En los aislados del animal 7 (figura 4.15B) se detectaron siete clones y en la mayoría de ellos los aislados procedían de la misma fase y estuvieron asociados a un resistotipo predominante, indicando un cambio en las poblaciones de *E. coli* predominantes en el medio intestinal de los conejos tratados con esta dosis de doxiciclina.

Los aislados del animal 8 (figura 4.15C) se distribuyeron en 7 grupos clonales asociados al mismo fenotipo de resistencia (DOX-ERI). Un clon detectado en la fase inicial agrupó aislados de la fase PT. En FT los aislados estuvieron agrupados en dos clones y mostraron un mismo resistotipo a excepción de un solo aislado. Los aislados de PT conformaron un mismo clon conjuntamente con 3 aislados de la fase inicial y todos ellos mostraron el mismo fenotipo de resistencia.

En los aislados del animal 9 se identificaron 6 clones, uno de ellos agrupó los diez aislados de AT y compartían un mismo perfil de resistencia a excepción de un solo aislado que fue sensible a doxiciclina. En FT se detectaron 2 clones uno de los cuales agrupó aislados de FT y PT. Los aislados restantes de PT se agruparon en dos clones distintos (figura 4.15.1D).

En el dendograma del animal 10 (figura 4.15.1E) se observó un comportamiento más homogéneo caracterizado por cinco clones conformados por aislados de una misma fase pero con diferentes fenotipos de resistencia.

En cuatro de los animales que recibieron la dosis media de doxiciclina no se detectaron clones en los que estuvieran incluidos aislados de las fases AT y FT, lo que indicaría que, al igual que lo observado en el grupo de los animales tratados con la dosis baja, se produce un cambio en las poblaciones de *E. coli* predominantes entre el inicio del ensayo y el final del tratamiento con doxiciclina. En los aislados procedentes del animal número 9 se encontraron relaciones genotípicas entre aislados de las fases de fin de tratamiento y post-tratamiento y que compartieron además el mismo fenotipo de resistencia (DOX-ERI).

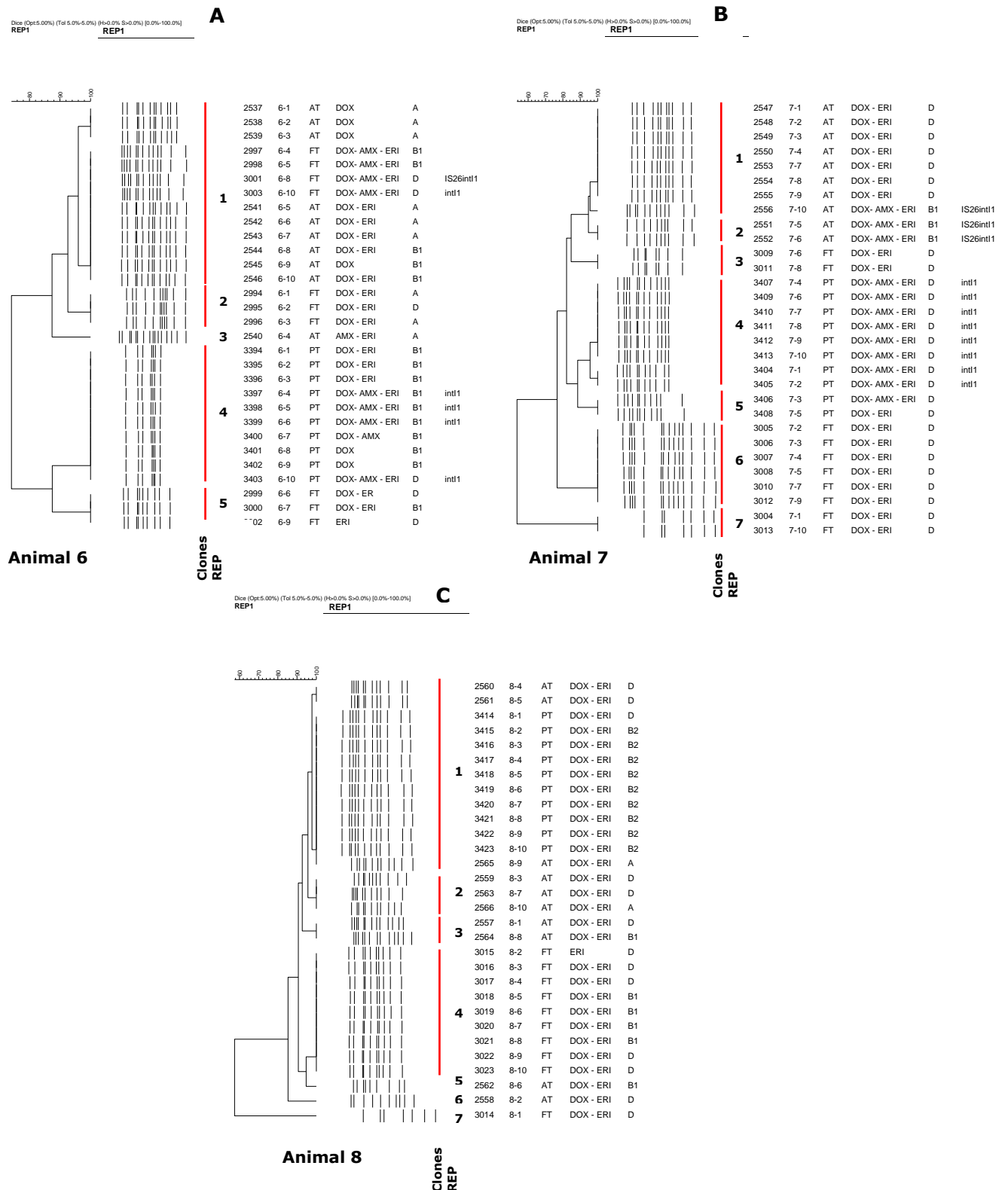


Figura 4.15. Similitud genética entre los aislados de *E. coli* de los animales tratados con 100 mg/L/d de doxiciclina (animales 6, 7 y 8). Los dendogramas fueron generados a partir del algoritmo de medias aritméticas de UPGMA para los aislados de cada animal en las tres fases del ensayo.

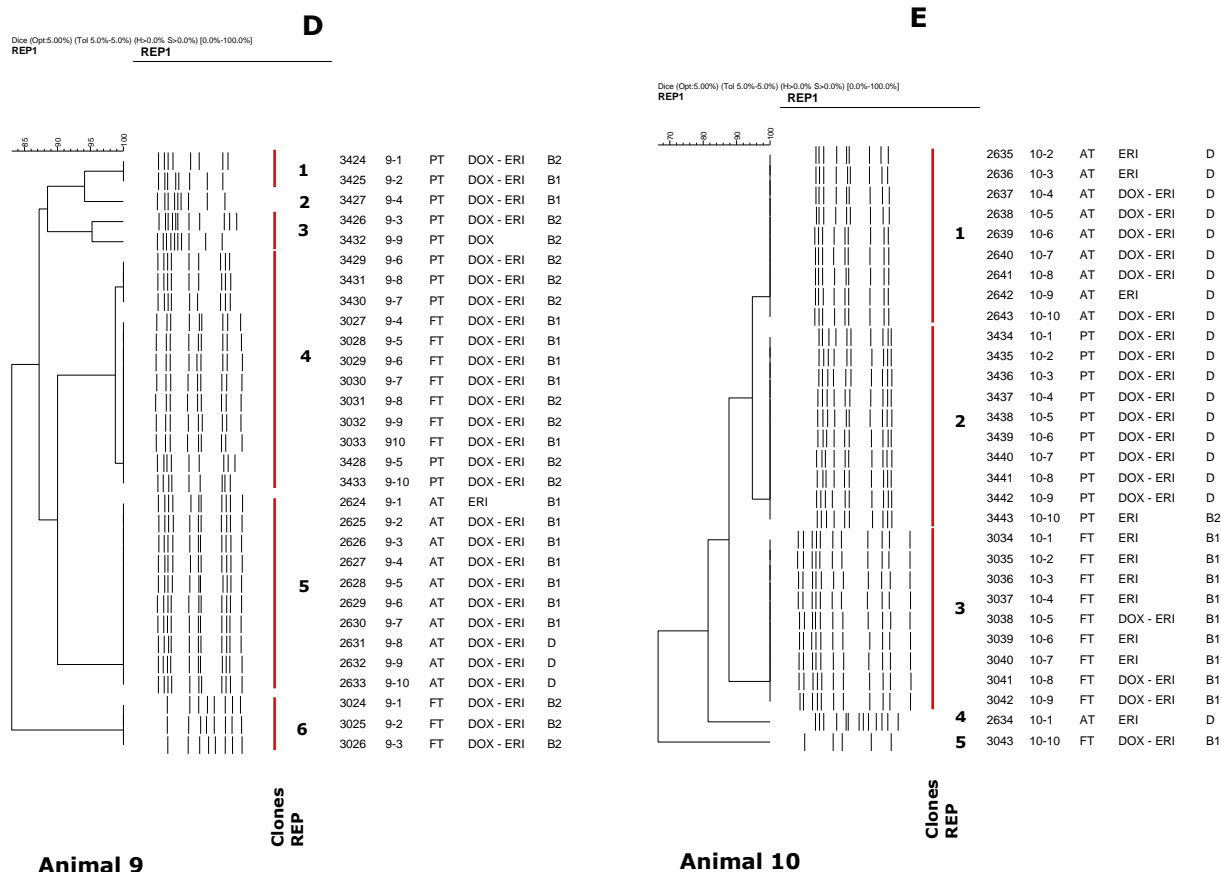


Figura 4.15.1. Similitud genética entre los aislados de *E. coli* de los animales tratados con 100 mg/L/d de doxiciclina (animales 9 y 10). Los dendogramas fueron generados a partir del algoritmo de medias aritméticas de UPGMA para los aislados de cada animal en las tres fases del ensayo.

4.10.2.3. Aislados de los animales tratados con 200 mg/L/d de doxiciclina

Los animales que conformaron este grupo fueron los número 11, 12, 13, 14 y 15. En el animal 12 solo se consiguieron aislados de *E. coli* en la fase PT y en el 15 se obtuvieron únicamente 5 aislados en AT y 2 en FT, por lo que no se incluyeron en el análisis. En los aislados procedentes de los animales de este grupo se encontró una mayor variabilidad de los perfiles genotípicos en las tres fases.

En el dendograma de los aislados procedentes del animal 11 (figura 4.16A) se evidenció la existencia de 5 clones conformados por aislados procedentes de la misma etapa. En AT se detectaron dos grupos clonales, uno integrado por nueve aislados pertenecientes a un mismo grupo filogenético (cuatro de ellos sensibles a doxiciclina y resistentes únicamente a eritromicina y los restantes sensibles a todos los antimicrobianos estudiados) y el otro solo contenía un aislado igualmente sensible a doxiciclina. Los aislados de FT estuvieron agrupados en dos clones

distintos y los aislados de cada clon por separado correspondieron a un mismo filogruppo. Puesto que en la fase de FT se detectaron clones con aislados resistentes a doxiciclina (2 de 8 en un clon y 2 de 2 en el otro), cabría esperar que estos fueron predominantes o mayoritarios, es decir, que el antimicrobiano hubiera contribuido a su selección, pero curiosamente se observaron seis aislados sin resistencia en uno de los clones. En PT los diez aislados se agruparon en un mismo clon con idéntico resistotipo y grupo filogenético.

En los aislados del animal 13 se detectó una mayor variabilidad representada por once grupos clonales. Los genotipos observados en la fase inicial y al final del tratamiento estuvieron asociados a un resistotipo predominante (DOX-ERI), mientras que 2 de los 3 clones encontrados en los aislados de PT mostraron un fenotipo de resistencia diferente (figura 4.16B). Finalmente en el dendograma de los aislados del animal 14 se observó un clon constituido por dos *clúster* relacionados, uno conformado por los diez aislados de AT y el otro por los de PT a excepción del aislado 3627 que constituía un clon por sí mismo. Todos estos aislados (a excepción del aislado 2724) compartieron el mismo resistotipo. Los aislados de FT estuvieron distribuidos en cinco clones distintos (figura 4.16C).

De manera global, y al igual que en los otros grupos de animales tratados, los aislados de *E. coli* de la fase inicial y la de fin de tratamiento provenientes de los animales tratados con la dosis alta se agruparon en clones diferentes, indicando que se produjo como en los casos anteriores, un cambio en las poblaciones de *E. coli* predominantes en la microbiota intestinal de los conejos entre estas dos etapas.

Un resultado que cabía esperar en este experimento es que el tratamiento antimicrobiano ejerciese una acción selectiva en la microbiota intestinal, incluida *E. coli*, hacia aislados resistentes al antimicrobiano que deberían ser predominantes al final del tratamiento. Sin embargo, este fenómeno no ha podido analizarse adecuadamente debido a que antes de la administración oral del antimicrobiano habían muchos aislados resistentes al antimicrobiano homólogo y solo los aislados procedentes del animal 11 (figura 4.16A) fueron sensibles a doxiciclina, no apreciándose con claridad el fenómeno aludido.

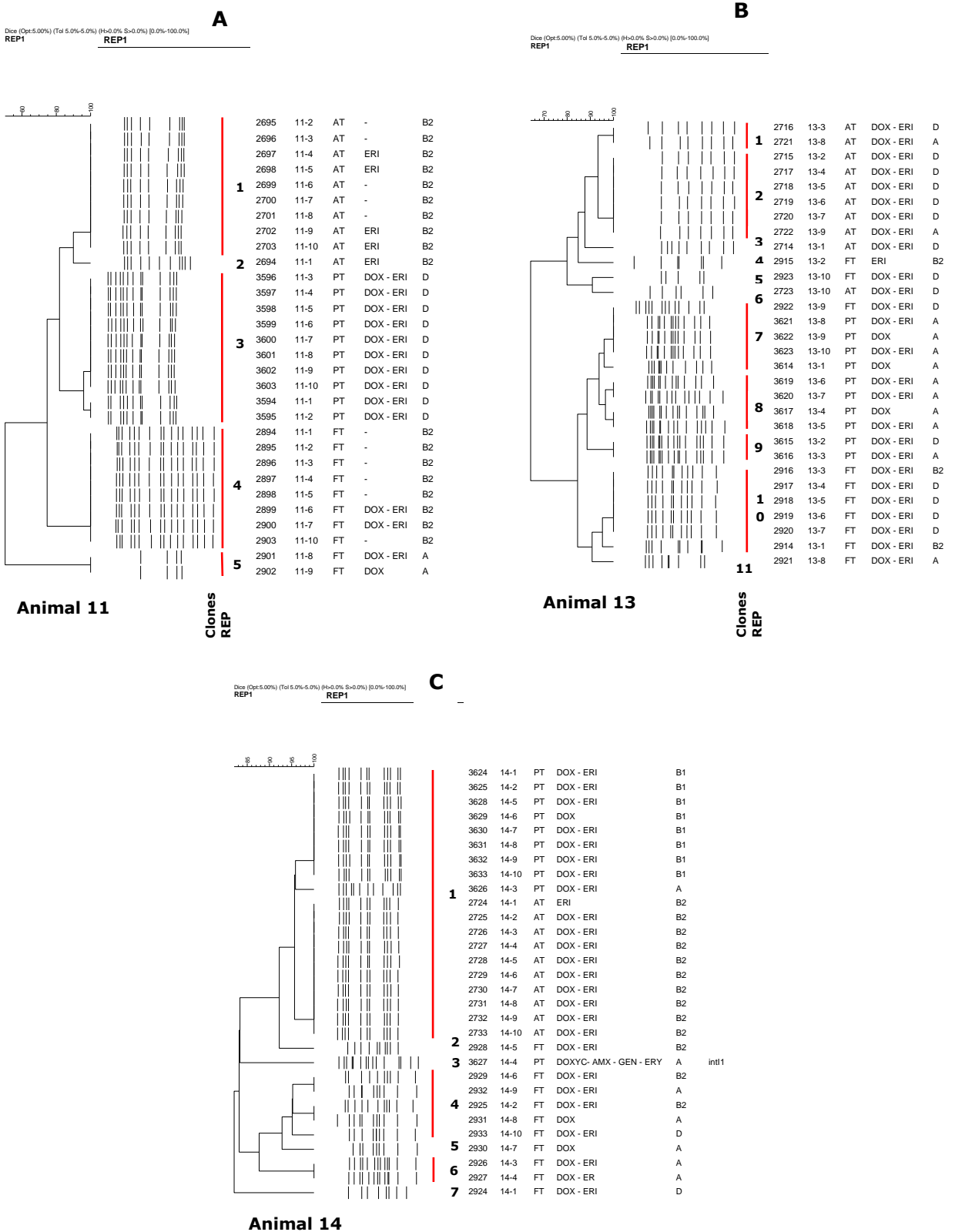


Figura 4.16. Similitud genética entre los aislados de *E. coli* de los animales tratados con 200 mg/L/d de doxiciclina (animales 11, 13, y 14). Los dendogramas fueron generados a partir del algoritmo de medias aritméticas de UPGMA para los aislados de cada animal en las tres fases del ensayo.

Al igual que en los animales del grupo control, pudo observarse que los aislados incluidos en un grupo clonal con un idéntico perfil REP y grupo filogenético mostraron en algunos casos fenotipos de resistencia diferentes. Asimismo, se observaron aislados pertenecientes a un mismo clon con un genotipo asociado a un fenotipo de resistencia. Según el estudio realizado por Bibbal y col. (2009), y como se mencionó anteriormente, un genotipo representado por la combinación del patrón de amplificación y el grupo filogenético puede estar asociado con diferentes fenotipos o perfiles de resistencia antimicrobiana, y un mismo perfil de resistencia puede estar asociado con diferentes genotipos. Estos resultados sugieren la posible transferencia horizontal de determinantes de resistencia en la población intestinal de *E. coli*.

Por otro lado, se deduce una posible fluctuación en el tiempo de las poblaciones bacterianas de *E. coli* que conforman la microbiota intestinal de los conejos, evidenciado por el hecho de que hay clones o genotipos que se detectan en la fase AT, no en la fase FT y vuelven a detectarse en PT.

Tanto en los animales del grupo control como en los tratados se observó que los aislados de la fase previa a la administración del tratamiento tendían a ser más parecidos desde el punto de vista de los perfiles genotípicos a los aislados de PT que a los de FT, lo que induce a pensar que se trata de un fenómeno natural o espontáneo en la dinámica de las poblaciones de *E. coli* influenciado por la edad de los animales, ya que el manejo fue el mismo en todos los grupos experimentales.

Finalmente podemos concluir que el análisis de los perfiles REP y su asociación con fenotipos de resistencia de los aislados de *E. coli* analizados en este estudio parece indicar que el tratamiento con doxiciclina vía oral originó un cambio en las poblaciones de *E. coli* predominantes en la microbiota intestinal de los conejos, favoreciendo en algunos casos el desarrollo de una población homogénea desde el punto de vista genotípico con el fenotipo de resistencia predominante DOX-ERI.

Capítulo 3

Resistencia antimicrobiana mediada por integrones

4.11. ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS MEDIADA POR INTEGRONES

4.11.1. SELECCIÓN DE LOS AISLADOS

Para ver si la diseminación de genes de resistencia estaba o no asociada con la presencia de integrones, se seleccionaron todos los aislados comensales resistentes a tres o más antimicrobianos diferentes. De esta manera, se analizaron un total de 69 aislados de *E. coli* con un fenotipo de resistencia a múltiples antimicrobianos como se muestra en la tabla 4.17, en la que puede verse la distribución de estos aislados según el animal de procedencia, el momento de la toma de la muestra y la pauta de tratamiento con doxiciclina.

Tabla 4.17. Distribución de los 69 aislados de *E. coli* multirresistentes según el animal de procedencia, el momento de la toma de la muestra y la pauta de tratamiento con doxiciclina

| Animal Nº | Pauta de tratamiento * | Número de aislados multirresistentes según momento de la toma de la muestra | | |
|--------------|---------------------------|--|-----------|-----------|
| | | AT | FT | PT |
| 2 | Control | 3 | - | - |
| 3 | Control | - | - | 10 |
| 4 | Control | - | - | 1 |
| 5 | Control | - | - | 1 |
| 6 | Media | 2 | - | 4 |
| 7 | Media | - | - | 8 |
| 12 | Alta | - | - | 10 |
| 14 | Alta | - | - | 1 |
| 17 | Baja | - | 5 | 3 |
| 18 | Baja | 5 | 8 | 6 |
| 19 | Baja | - | - | 2 |
| Total | | 10 | 13 | 46 |

*Grupo control: 0 mg/L/d; dosis baja (subterapéutica): 50 mg/L/d durante 12 días; dosis media (terapéutica): 100 mg/L/d durante 6 días; dosis alta (superior a la terapéutica): 200 mg/L/d durante 3 días

Del total de aislados estudiados, 49 (71,0%) fueron resistentes a tres antimicrobianos, 12 (17,4%) lo fueron a cuatro y 9 (13,0%) a cinco.

Se detectaron cuatro perfiles de resistencia diferentes, siendo el resistotipo mayoritario (68,1%, 47/69) el correspondiente a la resistencia a doxiciclina, amoxicilina y eritromicina (DOX-AMX-ERI), seguido del perfil de resistencia a 5 antimicrobianos: doxiciclina, amoxicilina, gentamicina, eritromicina y enrofloxacin (DOX-AMX-GEN-ERI-ENR) (17,4%, 12/69); el perfil de resistencia a 4 antimicrobianos: doxiciclina, amoxicilina, eritromicina y enrofloxacin (DOX-AMX-

ERI-ENR) se detectó en 9 (13,0%) de los aislados multirresistentes, mientras que el perfil doxiciclina, gentamicina y eritromicina (DOX-GEN-ERI) solo se encontró en un aislado (1,4%) (tabla 4.18).

4.11.2. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE INTEGRONES

La técnica de PCR permitió detectar integrones en 56 de los 69 (81,1%) aislados multirresistentes analizados procedentes de 11 animales (tabla 4.18) y en los que se detectó mayoritariamente el gen que codifica la integrasa clase 1 o *intI1*. Estos aislados estaban concentrados básicamente en la fase posterior al tratamiento. El gen *intI2* junto con el *intI1* solo se detectó en un aislado del animal número 1 y fase de PT. Este hallazgo coincide con el encontrado por King y col. (2005) en un aislado de cerdo. El gen de la integrasa de clase 3 no se identificó en ninguno de estos aislados, lo que coincide con lo señalado por Lu y col. (2010) en aislados de *E. coli* de animales de granja.

En 13 de de los 69 (18,6%) aislados analizados se encontró el gen de la integrasa *intI1* truncado por la secuencia de inserción IS26 (integrones no clásicos) y en ellos no pudo caracterizarse la región variable. Mayoritariamente estos aislados procedían de un mismo animal en dos fases experimentales distintas (AT y PT) (tabla 4.18).

En la figura 4.17 se muestran los resultados de la amplificación por PCR de los tres genes que codifican integrasas en una selección de los aislados investigados.

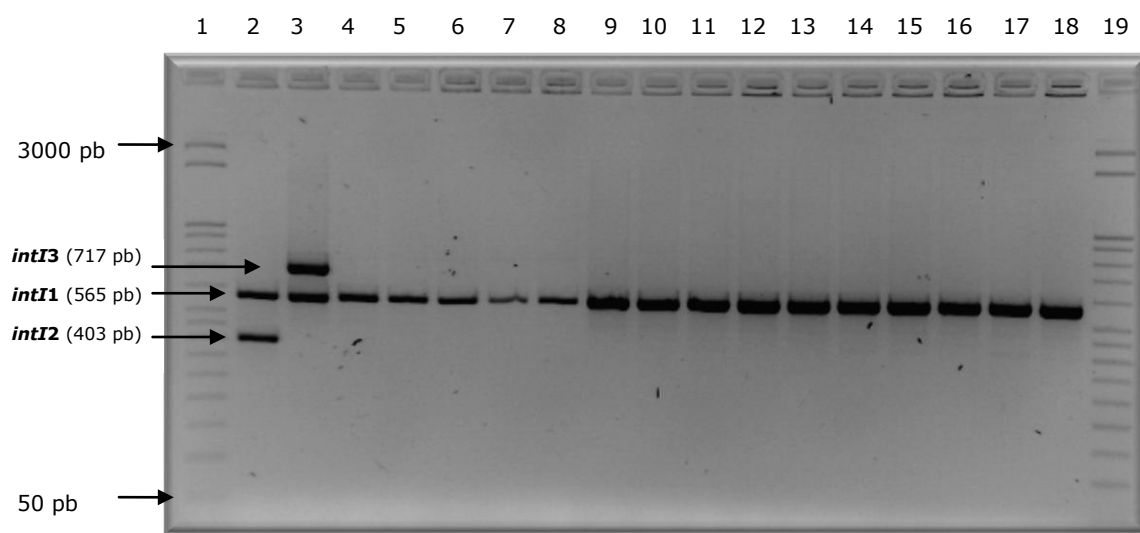


Figura 4.17. Imagen de los productos obtenidos por amplificación por PCR separados electroforéticamente en gel de agarosa al 2% de los genes que codifican la integrasa de los integrones de clase 1 (*intI1*), 2 (*intI2*) y 3 (*intI3*). Carriles 1 y 19: Marcador de peso molecular *Step Ladder* (50 bp); Carril 2: cepa de *E. coli* - control positivo de *intI1* e *intI2*; Carril 3: cepa de *Klebsiella pneumoniae* - control positivo de *intI3*; Carriles 4-8: aislados 3208 a 3212 portadores del gen *intI1* y negativos a *intI2* e *intI3*; Carriles 9-18: aislados 33148 a 3323 portadores del gen *intI1* y negativos a *intI2* e *intI3*.

Hasta la fecha no se han publicado estudios de frecuencia de detección de integrones en aislados comensales de *E. coli* de conejos. Sin embargo, en otros estudios se han hallado elevados porcentajes de detección de aislados multirresistentes de enterobacterias procedentes de diferentes animales, personas y ambientales portadores de integrones. En este sentido, Cocchi y col. (2007) encontraron con una mayor frecuencia integrones de clase 1 en aislados clínicos y comensales de *E. coli* provenientes de animales de granja (cerdos, aves y ganado vacuno). Trabajos previos muestran una alta prevalencia en otras colecciones de aislados de *E. coli* portadores de integrones de clase 1: 64.2% (43 de 67) en aislados de cerdos con diarrea (Kang y col., 2005b), 59% en aislados de terneros diarreicos (Du y col., 2005), 62% en aislados de cerdos (Maynard y col., 2003) y 45% en aislados del tracto urinario de pacientes hospitalizados (White y col., 2001). Otros investigadores han publicado una alta prevalencia de aislados portadores de integrones de clase 1 en animales de granja criados intensivamente, abarcando desde un 23 hasta un 44% (Sunde y Sorum, 1999; Kang y col., 2005a; Sunde, 2005), niveles comparables a la prevalencia encontrada en aislados clínicos de pacientes hospitalizados (Martinez-Freijo y col., 1998). Goldstein y col. (2001) encontraron un 73% de aislados de *E. coli* de aves, bovinos y cerdos portadoras de integrones de clase 1, 12% de aislados *intI2* positivos y un 10% de aislados

portadores de *intI1* e *intI2*. Zhang y col. (2009) detectaron genes de integrasas en 58,7 y 60,4% de aislados de cerdos y de pollos respectivamente. Antunes y col. (2006) detectaron un 79% de cepas portadoras de integrones en *Salmonella entérica* procedentes de productos de origen animal, un 77% en aislados clínicos de personas y un 50% en aislados ambientales. Sin embargo, los hallazgos de todos estos estudios no pueden compararse con los resultados obtenidos en este trabajo debido a las diferencias en el diseño experimental.

En relación a la distribución de los integrones en los 69 aislados de *E. coli* multirresistentes según el animal de procedencia, el momento de la toma de la muestra y la pauta de tratamiento, se evidenció que en la fase previa a la administración del tratamiento (AT) se detectaron 10 aislados (14,5% de los seleccionados para este estudio) con la integrasa de clase 1 truncada hacia la izquierda o hacia el extremo 5' por la secuencia de inserción IS26 (integrones no clásicos o integrones no funcionales); tres de estos aislados procedían de un animal del grupo control que no recibió tratamiento, constatando que para el momento del inicio del ensayo o situación de partida estos elementos genéticos estaban presentes en algunos de los aislados estudiados. Cabe mencionar que este es el primer estudio en el que se ha identificado la secuencia de inserción IS26 truncando la integrasa *intI1* en aislados comensales de conejos. Este hallazgo había sido detectado previamente en una cepa humana de *E. coli* (Naas y col., 2001). En la fase de FT se detectaron 13 aislados *intI1* positivos (18,8%) procedentes de 2 animales que recibieron una dosis baja o subterapéutica de doxiciclina. Un llamativo incremento en la detección de aislados multirresistentes portadores de integrones se observó en la fase posterior a la administración del tratamiento o PT, encontrándose en 46 aislados (66,7%) procedentes de un mayor número de animales tanto del grupo control (3/5) como de los animales tratados con las diferentes dosis de doxiciclina (7/15). En esta misma fase se detectó el único aislado portador de los genes *intI1* e *intI2* en el animal número 14, tratado con la dosis alta o superior a la terapéutica.

En la figura 4.18 se muestra gráficamente la distribución de los aislados portadores de integrones según el momento de la toma de la muestra. Aunque es algo que no puede descartarse, los resultados de este trabajo no permiten asociar el predominio de estos aislados en la fase PT con el tratamiento antimicrobiano ya que 12 de los aislados portadores de integrones encontrados en esta fase procedían de los animales del grupo control que no recibieron tratamiento (tabla 4.18). Tampoco la dosis o pauta de tratamiento tuvo un efecto detectable en este estudio sobre la frecuencia de detección de aislados portadores de integrones. El

predominio de estos aislados en la fase PT podría estar influenciado por factores inherentes al hospedador como la evolución de la población bacteriana en función de la edad.

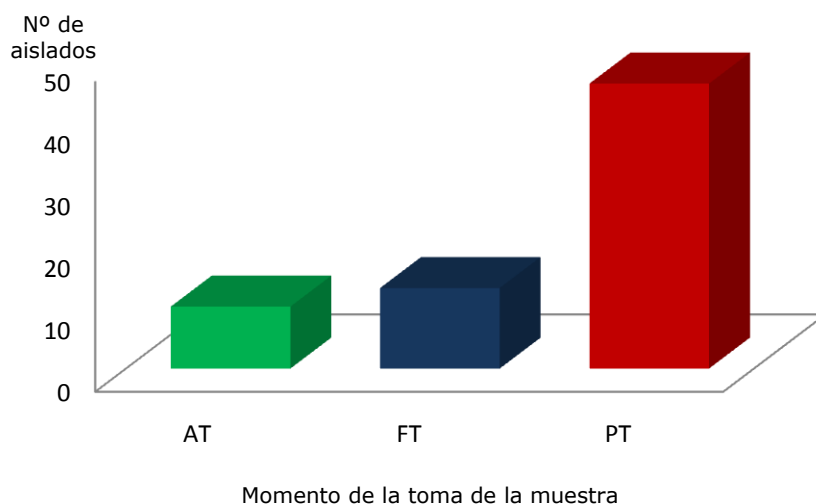


Figura 4.18. Número de aislados portadores de integrones según momento de la toma de la muestra

Se detectó un solo aislado *intI2* positivo junto con el gen *intI1* procedente de la fase de PT de un animal que recibió la dosis alta de doxiciclina. Los integrones de clase 2 que portan casetes en su estructura han sido documentados en aislamientos clínicos de bacterias gramnegativas aunque en una menor frecuencia que los integrones de clase 1 (Di Conza y Gutkind, 2010).

De los 56 aislados portadores del gen *intI1*, 41 (73,2%) presentaron la estructura clásica del integrón conformada por el extremo conservado 5' con el fragmento *intI-attI*, el extremo 3' CS con los genes *qacEΔ1* + *su1* y la región variable entre ambos extremos con casetes genéticos de resistencia (Partridge y col., 2009; Gonzalez y col., 2004). Uno de estos aislados (C-3627) procedente del animal 14 en la fase de PT y tratado con dosis alta de doxiciclina, contenía a la vez un integrón de clase 1 y un integrón de clase 2. La región variable del integrón de clase 1 (1600 pb) estuvo conformada por los genes casetes *dfrA1* + *aadA1* y la región variable del integrón de clase 2 (2200 pb) por los genes *dfrA1* + *sat2* + *aadA1*.

Por otro lado, 14 de los 56 aislados *intI1* positivos (25%) presentaron integrones de clase 1 no clásicos en los que no se pudo caracterizar la región 3' CS

(*qacEΔ1* + *sul1*) (figura 4.22). En la tabla 4.18 se detalla la distribución de estos aislados por animal, grupo de tratamiento y fase de la toma de la muestra. Asimismo, se realizó el estudio por PCR del gen *sul3*, que confiere resistencia a sulfamidas, con la finalidad de conocer si este gen sustituía la región *qacEΔ1* + *sul1* (genes que codifican resistencia a compuestos de amonio cuaternario y sulfamidas) y deducir su posible asociación a integrones de clase 1 no clásicos. En este sentido, todos los aislados fueron negativos al mencionado gen.

Los integrones de clase 1 no clásicos se han identificado en aislados de *E. coli* de diferentes orígenes. La ausencia de la región 3' CS es característica de los integrones de clase 1 portadores del transposón Tn402, conocido como Tn5090 (Radstrom y col., 1994). La unión del gen casete *sul1* con Tn5090/Tn402, que obedece a un mecanismo de integración y delección, da origen a estos integrones de clase 1 (Partridge y col., 2009).

En este estudio el gen *sul1*, que codifica una enzima dihidropteroato sintetasa (DHPS) responsable de la resistencia a sulfamidas (Swedberg y Skold, 1983), estuvo asociado a integrones de clase 1 como parte de la región 3' CS en 30 de los 43 aislados *sul1* positivos (69,8%). Algunos autores señalan que el gen *sul1* se encuentra comúnmente vinculado a otros genes de resistencia en integrones de clase 1 resistentes a sulfamidas de bacterias gramnegativas (van Treeck y col., 1981; Radstrom y col., 1991).

Coincidimos con otros autores en que sería necesario realizar estudios para determinar la posible localización de integrones de clase 1 carentes de la región 3' CS en otros elementos móviles como plásmidos y transposones facilitadores de la diseminación o transferencia horizontal de genes de resistencia (Jacoby, 1994).

Tabla 4.18. Caracterización de integrones de clase 1 en los aislados de *E. coli* de conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de doxiciclina

| Aislado de <i>E. coli</i> (n=69) | Nº de animal | Fase de tratamiento | Dosis* | Fenotipo de multirresistencia ^a | Tipo de configuración | Configuración de la región variable |
|----------------------------------|--------------|---------------------|---------|--|-----------------------------|-------------------------------------|
| C-2551 | 2 | AT | Control | DOX-AMX-ERI | Integrasa truncada por IS26 | Desconocida |
| C-2552 | 2 | AT | Control | DOX-AMX-ERI | Integrasa truncada por IS26 | Desconocida |
| C-2556 | 2 | AT | Control | DOX-AMX-ERI | Integrasa truncada por IS26 | Desconocida |
| C-2815 | 18 | AT | Baja | DOX-GEN-ERI | Integrasa truncada por IS26 | Desconocida |
| C-2818 | 18 | AT | Baja | DOX-AMX-ERI | Integrasa truncada por IS26 | Desconocida |
| C-2819 | 18 | AT | Baja | DOX-AMX-ERI | Integrasa truncada por IS26 | Desconocida |
| C-2820 | 18 | AT | Baja | DOX-AMX-ERI | Integrasa truncada por IS26 | Desconocida |
| C-2823 | 18 | AT | Baja | DOX-AMX-ERI | Integrasa truncada por IS26 | Desconocida |
| C-3001 | 6 | AT | Media | DOX-AMX-ERI | Integrasa truncada por IS26 | Desconocida |
| C-3003 | 6 | AT | Media | DOX-AMX-ERI | Clásica ^b | <i>aadB</i> |
| C-3208 | 17 | FT | Baja | DOX-AMX-ERI | Región 3'CS desconocida | Desconocida |
| C-3209 | 17 | FT | Baja | DOX-AMX-ERI | Región 3'CS desconocida | Desconocida |
| C-3210 | 17 | FT | Baja | DOX-AMX-ERI | Región 3'CS desconocida | Desconocida |
| C-3211 | 17 | FT | Baja | DOX-AMX-ERI | Región 3'CS desconocida | Desconocida |
| C-3212 | 17 | FT | Baja | DOX-AMX-ERI | Región 3'CS desconocida | Desconocida |
| C-3214 | 18 | FT | Baja | DOX-AMX-ERI | Región 3'CS desconocida | Desconocida |
| C-3216 | 18 | FT | Baja | DOX-AMX-ERI | Región 3'CS desconocida | Desconocida |
| C-3218 | 18 | FT | Baja | DOX-AMX-ERI | Clásica ^b | <i>aadB</i> |
| C-3219 | 18 | FT | Baja | DOX-AMX-ERI | Clásica ^b | <i>aadB</i> |
| C-3220 | 18 | FT | Baja | DOX-AMX-ERI | Región 3'CS desconocida | Desconocida |
| C-3221 | 18 | FT | Baja | DOX-AMX-ERI | Clásica ^b | <i>aadB</i> |
| C-3222 | 18 | FT | Baja | DOX-AMX-ERI | Clásica ^b | <i>aadB</i> |

Tabla 4.18. Cont.

| Aislado de <i>E. coli</i> (n=69) | Nº de animal | Fase de tratamiento | Dosis | Fenotipo de multirresistencia ^a | Tipo de configuración | Configuración de la región variable |
|----------------------------------|--------------|---------------------|---------|--|-------------------------|-------------------------------------|
| C-3223 | 18 | FT | Baja | DOX-AMX-ERI | Clásica | aadB |
| C-3314 | 3 | PT | Control | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | Clásica | dfrA12 + off + aadA2 |
| C-3315 | 3 | PT | Control | DOX-AMX-ERI-ENR | Clásica | dfrA12 + off + aadA2 |
| C-3316 | 3 | PT | Control | DOX-AMX-ERI-ENR | Clásica | dfrA12 + off + aadA2 |
| C-3317 | 3 | PT | Control | DOX-AMX-ERI-ENR | Clásica | dfrA12 + off + aadA2 |
| C-3318 | 3 | PT | Control | DOX-AMX-ERI-ENR | Clásica | dfrA12 + off + aadA2 |
| C-3319 | 3 | PT | Control | DOX-AMX-ERI-ENR | Clásica | dfrA12 + off + aadA2 |
| C-3320 | 3 | PT | Control | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | Clásica | dfrA12 + off + aadA2 |
| C-3321 | 3 | PT | Control | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | Clásica | dfrA12 + off + aadA2 |
| C-3322 | 3 | PT | Control | DOX-AMX-ERI-ENR | Clásica | dfrA12 + off + aadA2 |
| C-3323 | 3 | PT | Control | DOX-AMX-ERI-ENR | Clásica | dfrA12 + off + aadA2 |
| C-3327 | 4 | PT | Control | DOX-AMX-ERI | Clásica | aadB |
| C-3342 | 5 | PT | Control | DOX-AMX-ERI | Clásica | aadB |
| C-3399 | 6 | PT | Media | DOX-AMX-ERI | Clásica | aadB |
| C-3397 | 6 | PT | Media | DOX-AMX-ERI | Región 3'CS desconocida | Desconocida |
| C-3398 | 6 | PT | Media | DOX-AMX-ERI | Región 3'CS desconocida | Desconocida |
| C-3403 | 6 | PT | Media | DOX-AMX-ERI | Región 3'CS desconocida | Desconocida |
| C-3404 | 7 | PT | Media | DOX-AMX-ERI | Clásica | aadB |
| C-3405 | 7 | PT | Media | DOX-AMX-ERI | Clásica | aadB |
| C-3407 | 7 | PT | Media | DOX-AMX-ERI | Clásica | aadB |
| C-3409 | 7 | PT | Media | DOX-AMX-ERI | Clásica | aadB |
| C-3410 | 7 | PT | Media | DOX-AMX-ERI | Clásica | aadB |
| C-3411 | 7 | PT | Media | DOX-AMX-ERI | Clásica | aadB |
| C-3412 | 7 | PT | Media | DOX-AMX-ERI | Clásica | aadA2 |
| C-3413 | 7 | PT | Media | DOX-AMX-ERI | Región 3'CS desconocida | Desconocida |

Tabla 4.18. Cont.

| Aislado de <i>E. coli</i> (n=69) | Nº de animal | Fase de tratamiento | Dosis | Fenotipo de multirresistencia ^a | Tipo de configuración | Configuración de la región variable |
|----------------------------------|--------------|---------------------|-------|--|-----------------------------|-------------------------------------|
| C-3509 | 17 | PT | Baja | DOX-AMX-ERI | Región 3'CS desconocida | Desconocida |
| C-3510 | 17 | PT | Baja | DOX-AMX-ERI | Clásica ^b | <i>aadB</i> |
| C-3512 | 17 | PT | Baja | DOX-AMX-ERI | Clásica ^b | <i>aadB</i> |
| C-3514 | 18 | PT | Baja | DOX-AMX-ERI | Integrasa truncada por IS26 | Desconocida |
| C-3515 | 18 | PT | Baja | DOX-AMX-ERI | Región 3'CS desconocida | Desconocida |
| C-3519 | 18 | PT | Baja | DOX-AMX-ERI | Integrasa truncada por IS26 | Desconocida |
| C-3520 | 18 | PT | Baja | DOX-AMX-ERI | Clásica ^b | <i>aadA2</i> |
| C-3522 | 18 | PT | Baja | DOX-AMX-ERI | Clásica ^b | <i>aadA2</i> |
| C-3523 | 18 | PT | Baja | DOX-AMX-ERI | Integrasa truncada por IS26 | Desconocida |
| C-3524 | 19 | PT | Baja | DOX-AMX-ERI | Clásica ^b | <i>aadA2</i> |
| C-3527 | 19 | PT | Baja | DOX-AMX-ERI | Integrasa truncada por IS26 | Desconocido |
| C-3604 | 12 | PT | Alta | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | Clásica ^b | <i>dfrA1</i> + <i>aadA1</i> |
| C-3605 | 12 | PT | Alta | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | Clásica ^b | <i>dfrA1</i> + <i>aadA1</i> |
| C-3606 | 12 | PT | Alta | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | Clásica ^b | <i>dfrA1</i> + <i>aadA1</i> |
| C-3607 | 12 | PT | Alta | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | Clásica ^b | <i>dfrA1</i> + <i>aadA1</i> |
| C-3608 | 12 | PT | Alta | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | Clásica ^b | <i>dfrA1</i> + <i>aadA1</i> |
| C-3609 | 12 | PT | Alta | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | Clásica ^b | <i>dfrA1</i> + <i>aadA1</i> |
| C-3610 | 12 | PT | Alta | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | Clásica ^b | <i>dfrA1</i> + <i>aadA1</i> |
| C-3611 | 12 | PT | Alta | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | Clásica ^b | <i>dfrA1</i> + <i>aadA1</i> |
| C-3612 | 12 | PT | Alta | DOX-AMX-GEN-ERI | Clásica ^b | <i>dfrA1</i> + <i>aadA1</i> |
| C-3613 | 12 | PT | Alta | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | Clásica ^b | <i>dfrA1</i> + <i>aadA1</i> |

* Grupo control: 0 mg/L/d; dosis baja (subterapéutica): 50 mg/L/d durante 12 días; dosis media (terapéutica): 100 mg/L/d durante 6 días; dosis alta (superior a la terapéutica): 200 mg/L/d durante 3 días

^a Los datos de la columna hacen referencia a la resistencia a tres o más familias diferentes de antimicrobianos, siendo éstos los siguientes, DOX: doxiciclina;

AMX: amoxicilina; GEN: gentamicina; ERI: eritromicina; ENRO: enrofloxacin

^b Configuración clásica: 5'CS (*intI1*) + región variable + 3'CS (*qacΔE1* + *sul1*).

4.11.3. AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN VARIABLE DEL INTEGRÓN

En los 56 aislados en los que se habían detectado integrones se estudió por PCR su región variable (tabla 4.18).

La región variable no pudo estudiarse en 14 del total de aislados *intI1* positivos con ausencia de la región 3' CS, es decir, aislados *qacEΔ1* + *sul1* negativos o integrones no clásicos.

Se detectaron cuatro genes casetes diferentes en las regiones variables de los integrones caracterizados: *aadA*, *aadB*, *dfrA* y *sat2* (en el integrón de clase 2). De éstos, el gen *aadA* fue el detectado con mayor frecuencia encontrándose en 25 de los 69 (36,2%) aislados analizados, seguido del gen *dfrA* que se halló en un 30,4% (21/69) de los aislados.

El gen *aadB* se encontró en la región variable de 17 aislados distribuidos en 6 animales en las tres fases, y que mostraron el fenotipo de resistencia DOX-AMX-ERI.

La combinación *dfrA12* + *orfF* + *aadA2* se detectó en la región variable de 10 aislados correspondientes en su totalidad a la fase PT de un mismo animal del grupo control y con un fenotipo mayoritario DOX-AMX-ERI-ENR. Estos genes estaban contenidos en la región variable con un tamaño de 1800 pb.

La composición *dfrA1* + *aadA1* se detectó en la región variable (1600 pb) de 11 aislados de los cuales 10 correspondieron a la fase PT de un mismo animal que recibió una dosis alta, y presentaban el fenotipo de resistencia DOX-AMX-GEN-ERI-ENR. Otros investigadores también detectaron esta combinación de casetes genéticos de resistencia en aislados de *E. coli* de animales sanos (Sáenz y col., 2004; Sunde, 2005; Costa y col., 2008).

Las diferentes composiciones de genes casetes de los aislados de conejos integrón positivos aparecen ilustradas en las figuras 4.19 y 4.20.

Estudios previos revelan la presencia de la combinación *dfrA1* + *aadA1* en aislados de *E. coli* portadores de integrones de clase 1 (Mazel y col., 2000; Waturangi y col., 2003). Asimismo, en un estudio realizado en aislados de *Salmonella entérica* se encontró una predominancia de casetes que confieren resistencia a aminoglucósidos (genes *aadA*) y trimetoprim (gen *dfrA*) (Antunes y col., 2006). Estos autores señalan que la persistencia de estos genes podría estar asociada con el uso extensivo de estreptomicina en animales productores de

alimentos o probablemente sería el resultado de una asociación con otros genes de resistencia (co-selección) tales como el gen *sul1*.

En un estudio realizado en aislados de *E. coli* de cerdos con diarrea portadores de integrones de clase 1, los genes casetes *aadA1* y *aadA2* fueron los más frecuentemente encontrados en sus regiones variables con un 97% de frecuencia (Kang y col., 2005).

Los genes *dfrA12* + *orfF* + *aadA2* detectados en los diez aislados de la fase PT del animal 3 del grupo control, forman una combinación también encontrada en aislados multirresistentes de *E. coli* integrón clase 1 positivos aislados de pacientes hospitalizados al igual que la combinación *dfrA1* + *aadA1* (Chang y col., 2000). Yang y col. (2009) citan igualmente a estas dos combinaciones de genes como las comúnmente encontradas en aislados fecales de *E. coli* de personas y animales. Zhang y col. (2009) encontraron mayoritariamente la combinación de genes *dfrA12* + *orfF* + *aadA2* en aislados *intI1* positivos de cerdos y pollos (54,4% y 29,23% respectivamente). Esta combinación de genes casetes también fue detectada en dos cepas de *E. coli* integrón positivo de animales sanos (Costa y col., 2008).

Se identificó la composición de los genes casetes *dfrA1* + *sat2* + *aadA1* en la región variable (2200 pb) del único aislado portador de un integrón de clase 2 (figura 4.20), que procedía de la fase PT de un animal tratado con dosis alta de doxiciclina como se señaló anteriormente. Esta combinación de genes que confieren resistencia a trimetoprim (*dfrA1*), a estreptotricina (*sat2*) y a espectinomicina y estreptomicina (*aadA1*) ha sido descrita previamente en una cepa comensal de cerdo *intI2* positiva (Cocchi y col., 2007), en un aislado de *E. coli* del tracto gastrointestinal de un gato y en una cepa aislada del tracto respiratorio de un perro (Kadlec y Schwarz, 2008). Es importante resaltar la poca variabilidad genética encontrada en los integrones de esta clase, lo que obedece fundamentalmente a la presencia de un codón de terminación dentro de la integrasa que hace al gen *intI2* inactivo e inoperante para la incorporación de otros genes casetes distintos a los encontrados dentro de la estructura del integrón (Hansson y col., 2002). Esta característica está avalada por otros estudios que señalan que el gen *intI2* es a menudo interrumpido por un codón de terminación convirtiéndolo en un pseudogen, lo que explicaría los pocos genes que se encuentran descritos, en comparación con el número de genes casetes de los integrones de clase 1 (Crespo y col., 2005; Dubois y col., 2007).

Cabe destacar el hecho de que en los aislados comensales de *E. coli* estudiados se detecten genes de resistencia a antimicrobianos no empleados en las

explotaciones cunícolas, es decir, en ausencia de una presión selectiva directa ejercida por el uso de estos antimicrobianos tales como aminoglucósidos (genes *aadA*, *aadB*). Ello podría deberse a que estos genes estén ligados a casetes genéticos que confieren resistencia a otros antimicrobianos (Bischoff y col., 2005) usados actualmente aunque con una frecuencia relativamente baja como es el caso de sulfamidas, trimetoprim o una combinación de éstos, cuyo uso está limitado al tratamiento de ciertas patologías infecciosas en cunicultura.

El uso de trimetoprim en combinación con sulfametoxazol en el tratamiento de diversas infecciones en conejos de producción posiblemente esté influyendo en la selección de diferentes variantes de genes *dfr*, que transportados en integrones favorecen su diseminación entre bacterias comensales de la microbiota intestinal de conejos sanos destinados al consumo, lo que sería relevante tanto para la industria cunícola como desde el punto de vista de la Salud Pública. En nuestro estudio, un 39,6% (21/53) del total de los aislados que presentaron resistencia a trimetoprim + sulfametoxazol (SXT) tenían integrones en cuya región variable estaba incluido algún gen *dfr* responsable de la resistencia a trimetoprim. Skurnik y col. (2005) sostienen que los genes casetes *dfrA* y *aadA* una vez insertados en el integrón, e inclusive en ausencia de presión selectiva, pueden permanecer estables al menos durante un mes, sin embargo, este fenómeno no ha sido estudiado en períodos más largos.

Viñué (2010) encontró que todos los aislados resistentes a SXT contenían integrones que portaban al menos un gen *dfr*, e indica que los genes de resistencia a esta combinación de antimicrobianos están casi siempre incluidos en integrones, favoreciendo de esta manera la co-selección. Alvarez-Fernandez y col. (2003) hallaron una asociación estadísticamente significativa ($P < 0,01$) entre la presencia de integrones y la resistencia a SXT (50% de aislados integrón positivos y resistentes vs. 27% de aislados integrón negativos y resistentes)

Guerra y col. (2003) señalan la presencia de un único gen casete dentro de la región variable de los integrones de clase 1 (*aadA1a* en el 29% de aislados de *E. coli* provenientes de bovinos, cerdos y aves), al igual que en los aislados estudiados en este trabajo en los que se encontró un 30,4% de aislados con un único gen casete que confiere resistencia a aminoglucósidos (*aadB* o *aadA*). Sin embargo es conocido que la mayoría de los integrones de esta clase presentan por lo menos dos genes casetes. En este sentido Guerra y col. (2003) encontraron un 40% de aislados con integrones portadores de los genes *dfrA1* + *aadA1a* en aislados de *E. coli* de ganado vacuno, porcino y aves. Maynard y col. (2005)

refieren que los diferentes genes casetes incluidos en la región variable de los integrones detectados en aislados de *E. coli* de cerdos codificaban básicamente la resistencia a aminoglucósidos y trimetoprim. Los datos de dicho trabajo coinciden con los de los aislados de conejos portadores de integrones de clase 1 de nuestro estudio, cuya región variable estuvo constituida por dos o más genes casetes que codifican la resistencia a trimetoprim y a aminoglucósidos fundamentalmente.

Algunos autores hacen mención a la frecuente presencia de genes de resistencia a aminoglucósidos localizados en integrones (Lévesque y col., 1995; Sallen y col., 1995; Peters y col., 2001). La caracterización de integrones realizada por Skurnik y col. (2006) en aislados de *E. coli* de origen fecal provenientes de granjas de animales bajo explotación intensiva permitió observar una pequeña diversidad en el contenido de genes casetes, representados por los genes *aadA* o *dfrA*. En un estudio publicado por Machado y col. (2005) se expone que los integrones fueron frecuentemente encontrados en aislados de *E. coli* resistentes de pacientes hospitalizados, aunque la presencia de genes casetes que codifican resistencia a un antimicrobiano en particular se demostró solamente para trimetoprim, sulfonamida, estreptomicina, amikacina, gentamicina o kanamicina, resultados que coinciden con los obtenidos en este trabajo.

Otras investigaciones señalan que el gen casete *aadA* se encuentra frecuentemente en integrones de clase 1 en aislados clínicos y ambientales (Clark y col., 1999; Chang y col., 2000; Barlow y col., 2004; Antunes y col., 2007). En este sentido, trabajos previos hacen mención a que bacterias portadoras de genes de resistencia localizados en integrones pueden ser transferidas desde el suelo a animales y personas a través de los cultivos o del agua potable (Salysers, 2002; Agerso y Sandvang, 2005).

Aislados de *E. coli*

Animal 6: C-3003 (AT), C-3399 (PT)
Animal 8: C- 3218, C-3219, C-3221, C-3222, C-3223 (FT)
Animal 4: C-3227 (PT)
Animal 5: C-3342 (PT)
Animal 7: C-3404, C-3405, C-3407, C-3409, C-3410 (PT)
Animal 17: C-3512, C-3514 (PT)



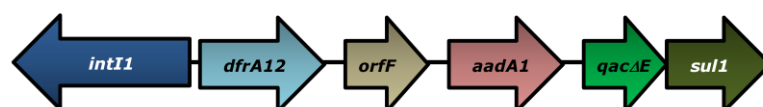
Animal 7: C-3412 (PT)
Animal 18: C- 3520, C-3522 (PT)
Animal 19: C-3524 (PT)



Animal 12: C-3604, C-3605, C-3606, C-3607, C-3608, C-3609, C-3610, C-3611, C-3612, C-3613 (PT)
Animal 4: C-3627 (PT)



Animal 4: C-3314, C-3315, C-3316, C-3317, C-3318, C-3319, C-3320, C-3321, C-3322, C-3323 (PT)



↔
500 pb

Figura 4.19. Representación esquemática de la estructura de los integrones de clase 1 y de la composición de casetes genéticos de resistencia analizados por secuenciación en aislados de *E. coli* de conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de tratamiento con doxiciclina

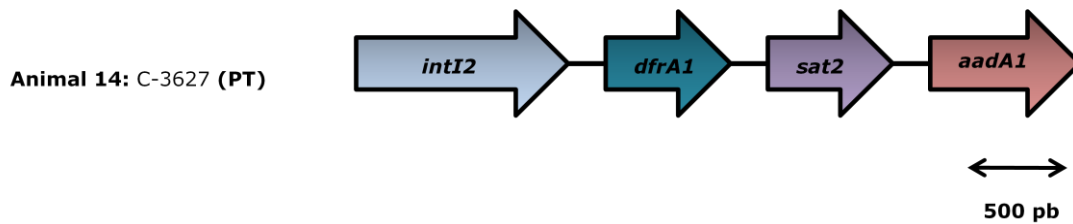


Figura 4.20. Representación esquemática de la estructura de los integrones de clase 2 y de la composición de casetes genéticos de resistencia analizados por secuenciación en aislados de *E. coli* de conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de tratamiento con doxiciclina.

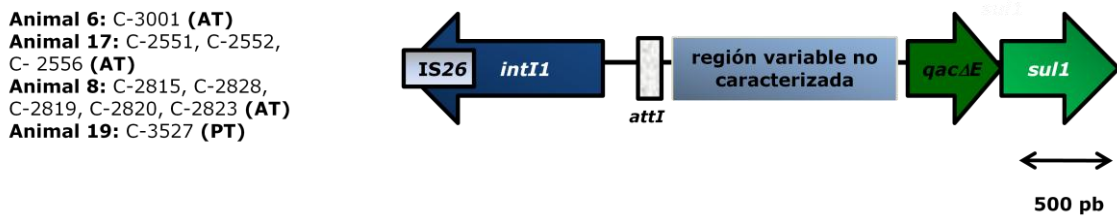


Figura 4.21. Representación esquemática de los integrones de clase 1 truncados por la secuencia de inserción IS26 (integrón de clase 1 no clásico) en aislados de *E. coli* de conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de tratamiento con doxiciclina

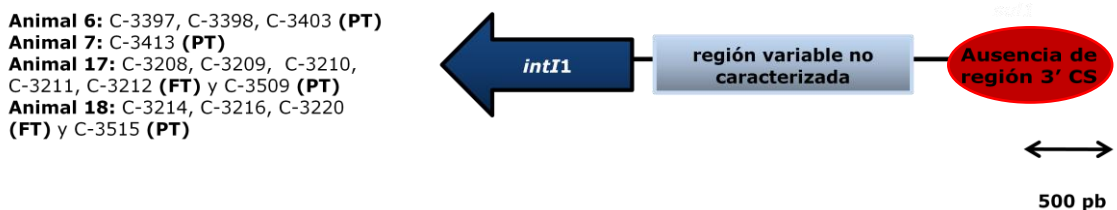


Figura 4.22. Representación esquemática de la estructura de los integrones de clase 1 no clásicos en aislados de *E. coli* de conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de tratamiento con doxiciclina

4.11.4. Asociación entre la presencia de integrones y la resistencia a antimicrobianos

Se compararon los porcentajes individuales de resistencia para todos los antimicrobianos ensayados (a excepción de la colistina, para la cual no se obtuvieron aislados resistentes) entre los aislados comensales portadores de integrones y aquellos en los cuales la integrasa estaba truncada hacia el extremo 5' por la secuencia de inserción IS26 (integrones no clásicos, no funcionales o

inactivos) (figura 4.21). Estos últimos fueron muy similares entre sí, ya que como máximo fueron resistentes a tres antimicrobianos (figura 4.23). Asimismo presentaron el mismo fenotipo de multirresistencia (DOX-AMX-ERI), con lo cual no podría descartarse la posibilidad de que en la región variable de estos integrones estuvieran presentes casetes genéticos similares a los de los aislados resistentes a tres antimicrobianos con presencia de integrón de clase 1. Además, el hecho de que la integrasa estuviera truncada por la IS26 no significa que esos genes casetes no estuvieran presentes dentro de la región variable y mucho menos que no pudieran expresarse.

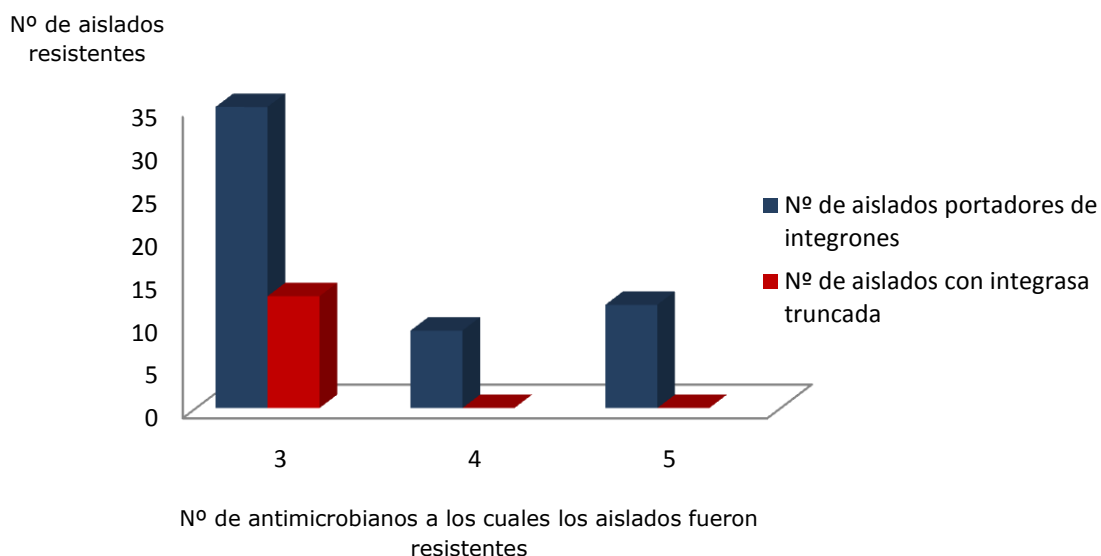


Figura 4.23. Asociación entre fenotipo de multirresistencia a antimicrobianos y la presencia de integrones de clase 1 en aislados de *E. coli* de conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de doxiciclina

Se observó una diferencia estadísticamente significativa en los porcentajes de resistencia a gentamicina ($P < 0,01$) y enrofloxacina ($P < 0,0001$) entre los aislados con integrones y los aislados con integrasa truncada o integrones inactivos, lo que posiblemente esté asociado con la presencia de genes casetes que confieren resistencia a estos antimicrobianos en los aislados con integrones (tabla 4.19).

Tabla 4.19. Resistencia a antimicrobianos de los aislados de conejo de *E. coli* portadores de integrones y de integrasa truncada (integrones no clásicos)

| Antimicrobiano | Aislados con integrones (n=56) | | Aislados con integrasa truncada (integrones no clásicos)* (n=13) | |
|----------------|--------------------------------|-------|--|-------------------|
| | Nº de resistentes | % | Nº de resistentes | % |
| Doxiciclina | 56 | 100,0 | 13 | 100,0 |
| Amoxicilina | 56 | 100,0 | 13 | 100,0 |
| Gentamicina | 14 ^a | 25,0 | 1 | 7,7 ^b |
| Eritromicina | 56 | 100,0 | 13 | 100,0 |
| Enrofloxacin | 19 ^c | 34,0 | 0 | 00,0 ^d |

* En estos aislados la integrasa estuvo truncada hacia el extremo 5' por la secuencia de inserción IS26 (integrones no clásicos, no funcionales o inactivos)

$P^{a,b} < 0.01$

$P^{c,d} < 0.0001$

En el caso del aminoglucósido estudiado, la presencia del gen *aadB* (*ant2''*)-I que confiere resistencia a gentamicina, tobramicina y kanamicina a través de un mecanismo de modificación enzimática del aminoglucósido por acción de la enzima O-adeniltransferasa (Recchia y Hall, 1995b) podría explicar estas diferencias. Sin embargo, es de resaltar que, a pesar de que en estos aislados, se encontró el gen *aadB* en la región variable del integrón, la presencia del gen no se correspondió con el fenotipo de resistencia, ya que los aislados fueron sensibles a gentamicina (tabla 4.18), por lo que cabe suponer que el gen no se esté expresando o no esté activo por razones no estudiadas en este trabajo.

A manera de referencia, algunos estudios muestran porcentajes mayores de aislados resistentes a gentamicina en aislados clínicos de *E. coli* de perros y gatos portadores de integrones (47,8%), en comparación con los aislados integrón negativos (10,2%) (Shaheen y col., 2010). En otro estudio en el que se caracterizó un grupo de aislados de la familia *Enterobacteriaceae* (*Pseudomonas spp.*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*) para estudiar la asociación entre la presencia de integrones y de genes aminoglucósidos resistentes, se detectaron los genes *ant2''*-I, *aac(3)*-Ia y *aac(3)*-IIa en dichos aislados. De éstos genes casetes, *ant2''*-I fue el más comúnmente encontrado dentro de un integrón de clase 1 (Lévesque y col., 1995).

En el caso de la enrofloxacin, la resistencia detectada únicamente en los aislados con integrones (tabla 4.19) puede deberse posiblemente a la presencia de genes que codifican un mecanismo de resistencia a este antimicrobiano y que no forman parte de los genes casetes contenidos en la región variable, pudiendo localizarse en otras estructuras genéticas como plásmidos o transposones. La asociación entre integrones y resistencia a fluoroquinolonas es un fenómeno conocido (Martínez-Freijo y col., 1998) y probablemente esté relacionado con la presencia de integrones en plásmidos mutagénicos (Ambler y Pinney, 1995), o bien con la presencia de plásmidos que porten genes que alteren la permeabilidad celular o que tengan mecanismos de transporte extracelular (Poole, 1994; Piddock, 1995).

Se observaron altos porcentajes de resistencia a doxiciclina, amoxicilina y eritromicina en ambos grupos de aislados, debido posiblemente a la presencia de genes que codifican resistencia a estos antimicrobianos y que en este estudio no fueron identificados dentro de la región variable de los aislados portadores de integrones. Tal es el caso de los genes *tet* y de los genes *bla* (presentes en los aislados resistentes) que confieren resistencia a tetraciclinas y betalactámicos respectivamente y que pudieran estar presentes en un plásmido o en un transposón.

La adquisición de integrones se considera la mayor causa de multirresistencias en bacterias gramnegativas, principalmente en enterobacterias y pseudomonas. Varios estudios han mostrado que entre un 43 y un 50% de los aislados clínicos europeos recientes son portadores de integrones y están significativamente asociados con resistencia a antimicrobianos en mayor medida que los aislados integrón negativos (Jones y col., 1997; Martínez-Freijo y col., 1998; Álvarez-Fernández, 2003). Previamente Lévesque y col. (1995) encontraron cerca de 75% de aislados clínicos resistentes a aminoglucósidos portadores de integrones incluyendo principalmente el gen casete *aadA*.

4.11.5. Identificación de grupos filogenéticos en aislados comensales de *E. coli* portadores de integrones

Se realizó la identificación del grupo filogenético en todos los aislados de *E. coli* resistentes a tres o más antimicrobianos portadores de integrones. El grupo filogenético D fue el detectado con mayor frecuencia (62,5%) entre los aislados *intI1* positivos y que estaba presente en 6 de los 10 animales con aislados *intI1* positivos. Los aislados de este grupo mostraron una mayor asociación con el

fenotipo de resistencia a 3 antimicrobianos (DOX-AMX-ERI) (un 60,0% del total de aislados pertenecientes a este grupo). No obstante, también se detectó en fenotipos con multirresistencia a 4 y 5 antimicrobianos. Por otro lado, se encontró que no hubo asociación entre pertenecer al grupo D y la presencia de integrones ($P=0,13$).

El grupo B2 se detectó en 9 aislados (16%) procedentes de 3 animales y asociados igualmente y en un mayor porcentaje (77,8%) con el fenotipo de multirresistencia a 3 antimicrobianos DOXI-AMX-ERI.

En nuestro estudio el grupo A se detectó en 8 aislados (14%) *intI1* positivos procedentes de tres animales, asociados fundamentalmente con el resistotipo DOXI-AMX-GEN-ERI-ENR. El grupo B1 fue detectado con menor frecuencia encontrándose en solo 4 aislados *intI1* positivos (7%) procedentes de dos animales y relacionados en su totalidad con el fenotipo de resistencia a tres antimicrobianos (DOX-AM-ERI), lo que no coincide con lo hallado por Carlos y col. (2010) quienes encontraron una mayor prevalencia de aislados fecales en animales herbívoros correspondientes al grupo B1. En base a la datos presentados en este trabajo se observó que los cuatro grupos filogenéticos que definen la estructura poblacional de *E. coli* fueron identificados en este estudio (figura 4.24 y tabla 4.20) y que estaban asociados mayoritariamente con el resistotipo DOX-AMX-ERI. Escobar-Páramo y col. (2004) y Gordon y Cowling. (2003) observaron diferencias en la frecuencia de los cuatro grupos filogenéticos en aislados comensales en función del hospedador.

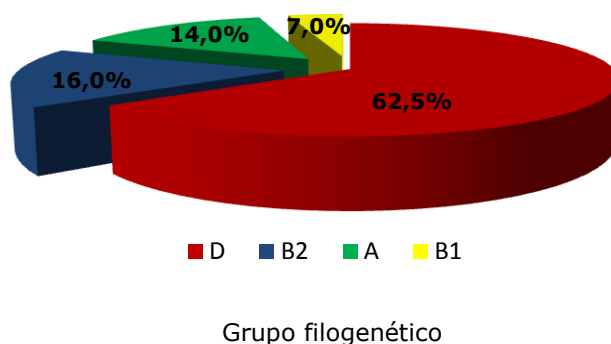


Figura 4.24. Distribución porcentual de los aislados portadores de integrones analizados en este estudio en los 4 grupos filogenéticos de *E. coli*

Tabla 4.20. Identificación de grupos filogenéticos en los aislados de *E. coli* con integrones clase 1 (*intI1*) y clase 2 (*intI2*)

| Cepa de <i>E. coli</i> (n=69) | Nº de animal | Fenotipo de multirresistencia | Fase | Integrasa | Grupo filogenético |
|-------------------------------|--------------|-------------------------------|------|---------------------|--------------------|
| C-3003 | 6 | DOX-AMX-ERI | AT | <i>intI1</i> | D |
| C-3208 | 17 | DOX-AMX-ERI | FT | <i>intI1</i> | B2 |
| C-3209 | 17 | DOX-AMX-ERI | FT | <i>intI1</i> | B2 |
| C-3210 | 17 | DOX-AMX-ERI | FT | <i>intI1</i> | D |
| C-3211 | 17 | DOX-AMX-ERI | FT | <i>intI1</i> | B2 |
| C-3212 | 17 | DOX-AMX-ERI | FT | <i>intI1</i> | B2 |
| C-3214 | 18 | DOX-AMX-ERI | FT | <i>intI1</i> | B2 |
| C-3216 | 18 | DOX-AMX-ERI | FT | <i>intI1</i> | D |
| C-3218 | 18 | DOX-AMX-ERI | FT | <i>intI1</i> | D |
| C-3219 | 18 | DOX-AMX-ERI | FT | <i>intI1</i> | D |
| C-3220 | 18 | DOX-AMX-ERI | FT | <i>intI1</i> | D |
| C-3221 | 18 | DOX-AMX-ERI | FT | <i>intI1</i> | D |
| C-3222 | 18 | DOX-AMX-ERI | FT | <i>intI1</i> | D |
| C-3223 | 18 | DOX-AMX-ERI | FT | <i>intI1</i> | D |
| C-3314 | 3 | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3315 | 3 | DOX-AMX-ERI-ENR | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3316 | 3 | DOX-AMX-ERI-ENR | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3317 | 3 | DOX-AMX-ERI-ENR | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3318 | 3 | DOX-AMX-ERI-ENR | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3319 | 3 | DOX-AMX-ERI-ENR | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3320 | 3 | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3321 | 3 | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3322 | 3 | DOX-AMX-ERI-ENR | PT | <i>intI1</i> | B2 |
| C-3323 | 3 | DOX-AMX-ERI-ENR | PT | <i>intI1</i> | B2 |
| C-3327 | 4 | DOX-AMX-ERI | PT | <i>intI1</i> | B2 |
| C-3342 | 5 | DOX-AMX-ERI | PT | <i>intI1</i> | B1 |
| C-3399 | 6 | DOX-AMX-ERI | PT | <i>intI1</i> | B1 |
| C-3397 | 6 | DOX-AMX-ERI | PT | <i>intI1</i> | B1 |
| C-3398 | 6 | DOX-AMX-ERI | PT | <i>intI1</i> | B1 |
| C-3403 | 6 | DOX-AMX-ERI | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3404 | 7 | DOX-AMX-ERI | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3405 | 7 | DOX-AMX-ERI | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3407 | 7 | DOX-AMX-ERI | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3409 | 7 | DOX-AMX-ERI | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3410 | 7 | DOX-AMX-ERI | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3411 | 7 | DOX-AMX-ERI | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3412 | 7 | DOX-AMX-ERI | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3413 | 7 | DOX-AMX-ERI | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3509 | 17 | DOX-AMX-ERI | PT | <i>intI1</i> | B2 |
| C-3510 | 17 | DOX-AMX-ERI | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3512 | 17 | DOX-AMX-ERI | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3515 | 18 | DOX-AMX-ERI | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3520 | 18 | DOX-AMX-ERI | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3522 | 18 | DOX-AMX-ERI | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3524 | 19 | DOX-AMX-ERI | PT | <i>intI1</i> | A |
| C-3604 | 12 | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3605 | 12 | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3606 | 12 | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3607 | 12 | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | PT | <i>intI1</i> | D |
| C-3608 | 12 | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | PT | <i>intI1</i> | A |
| C-3609 | 12 | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | PT | <i>intI1</i> | A |
| C-3610 | 12 | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | PT | <i>intI1</i> | A |
| C-3611 | 12 | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | PT | <i>intI1</i> | A |
| C-3612 | 12 | DOX-AMX-ERI-ENR | PT | <i>intI1</i> | A |
| C-3613 | 12 | DOX-AMX-GEN-ERI-ENR | PT | <i>intI1</i> | A |
| C-3627 | 14 | DOX-AMX-ERI-ENR | PT | <i>intI1, intI2</i> | A |

Contrariamente a nuestro hallazgos, Cochi y col. (2007) encontraron que los integrones eran más frecuentes en aislados del grupo filogenético A que en los grupos B1, B2 y D ($P=0,00147$), los cuales mostraron una similar distribución de los integrones.

En definitiva se encontró una importante variación de la frecuencia relativa de los distintos grupos filogenéticos en los aislados multirresistentes en este estudio, observándose una sobrerrepresentación del grupo filogenético D, lo cual es un hecho llamativo si nos basamos en estudios previos en los cuales se ha detectado en mamíferos una mayor frecuencia de aislados de *E. coli* pertenecientes a los grupos A y B1 (Bibbal y col., 2009; Tenaillon y col., 2010), mientras que los aislados de *E. coli* del grupo D son menos frecuentes (Gordon y Cowling, 2003; Escobar-Paramo y col., 2006; Skurnik y col., 2006; Bibbal y col., 2009; Nowrouzian y col., 2009).

En base a nuestros resultados se podría pensar en una correlación hipotética de estos hallazgos con el origen de los aislados según la especie animal, con las características propias de la microbiota intestinal de los conejos, la dieta, masa corporal o simplemente como consecuencia de la presión selectiva antibiótica, dando lugar a una mayor representación numérica y porcentual de determinados filogrupos, como sugieren Carlos y col. (2010) en un estudio realizado en otros mamíferos. En relación a este último factor, Walk y col. (2007) encontraron una sobreabundancia de aislados de *E. coli* resistentes a ampicilina en granjas lecheras convencionales cuyos animales fueron tratados con este antimicrobiano. Estos investigadores hipotetizaron que la diferencia en la composición genética de la población de *E. coli* de estos animales podía estar vinculada a un mayor uso de ampicilina en granjas convencionales. Otros estudios realizados en personas y animales plantearon que antes de la administración de un antimicrobiano, el principal grupo filogenético entre los aislados de *E. coli* fue B1, seguido del grupo A (Maynard y col., 2004; Bonacorsi y Bingen, 2005; Moulin-Schouleur y col., 2007).

Skurnik y col. (2005) encontraron que aislados clínicos de *E. coli* del grupo B2 eran menos resistentes a varios antimicrobianos en comparación con aislados pertenecientes a otros grupos filogenéticos o aislados no B2.

Si analizamos la distribución de la totalidad de los aislados de *E. coli* en función del grupo filogenético al que pertenecen, e independientemente de que fueran portadores o no de integrones, observamos que estos aislados tanto en los animales del grupo control como en los tratados, pertenecían mayoritariamente al grupo filogenético D seguido del B2. Según indican otros estudios, las cepas

extraintestinales patógenas pertenecen en su mayoría a los grupos D y B2 (Johnson y Stell, 2000; Picard y col., 1999; Picard y Goullet, 1989), hallazgo que llama la atención pues en principio los aislados analizados son comensales y es posible que lo descrito para otras especies no sea aplicable a los conejos.

En las figuras 4.25 y 4.26 puede observarse como en la fase AT tanto en los controles como en los tratados los aislados predominantes correspondieron al filogrupo D seguido del A, lo que indica que se trata de una población heterogénea en virtud de que los aislados pertenecientes al grupo A son considerados como parte de la microbiota comensal intestinal (Bingen y col., 1998). Tanto en la fase de FT como en PT en los animales controles se observó una disminución en los porcentajes de aislados del filogrupo A y una predominancia de aislados pertenecientes a los grupos filogenéticos D y B2 (figura 4.25). Una tendencia similar se observó en los animales tratados, mostrándose una distribución muy similar de los porcentajes de aislados de *E. coli* pertenecientes a los cuatro filogrupos tanto en FT como en PT (figura 4.26).

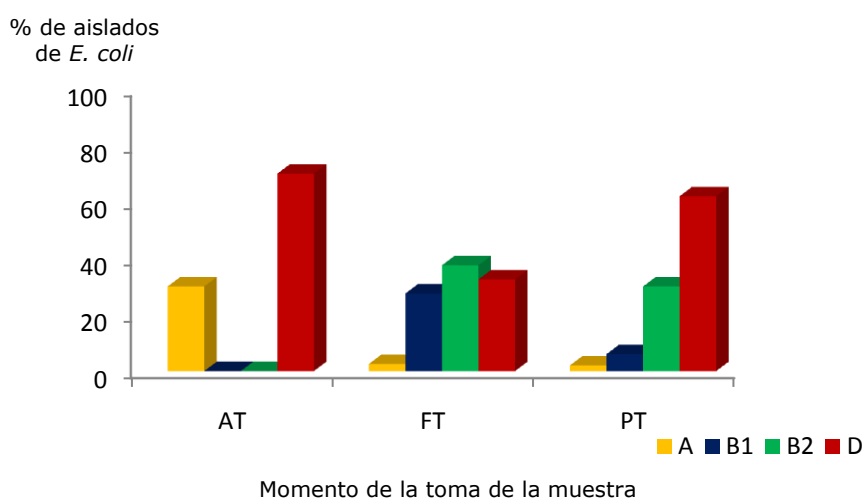


Figura 4.25. Identificación de grupos filogenéticos en los aislados de *E. coli* procedentes de los conejos del grupo control

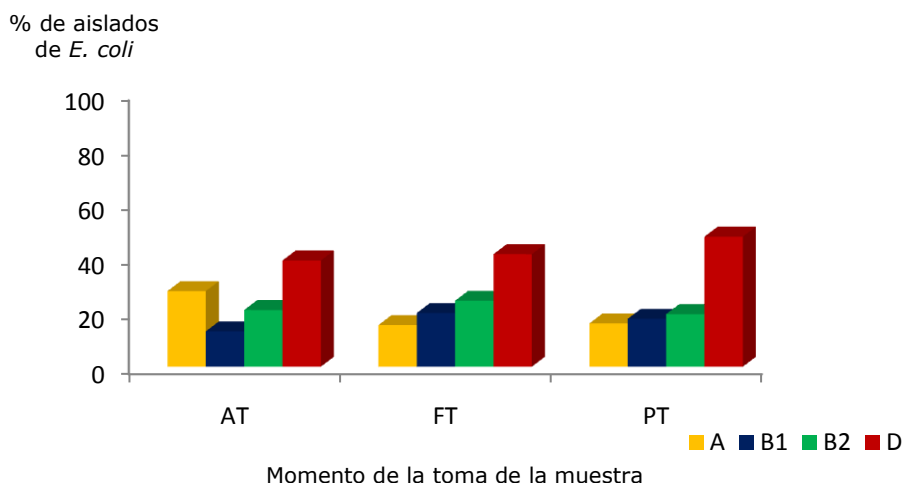


Figura 4.26. Identificación de grupos filogenéticos en los aislados de *E. coli* procedentes de los conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de doxiciclina

Finalmente, los resultados de esta investigación muestran poca variabilidad de genes de resistencia a antimicrobianos detectados en las regiones variables de los integrones caracterizados.

Por otro lado, deberían realizarse experimentos de conjugación con el fin de comprobar que los aislados portadores de integrones detectados en este estudio pueden servir como reservorios potenciales para la diseminación de genes de resistencia a diferentes antimicrobianos (Nogrady y col., 2006; Boucher y col., 2007).

Muchas otras investigaciones avalan el hecho de que la transferencia horizontal de integrones se considera como el mecanismo más eficiente para la diseminación de genes de resistencia y la emergencia de aislados multirresistentes (Rowe-Magnus y Mazel, 2001; Hanau-Bercot y col., 2002).

Lu y col. (2010) sugieren que la resistencia a antimicrobianos y la presencia de integrones fue consistente con la presión de selección antimicrobiana, lo cual subraya la importancia de un uso prudente y alternado de agentes antimicrobianos tanto en medicina humana como en veterinaria. Asimismo, señalan que la transferencia horizontal y vertical fue observada jugando un rol importante en la diseminación de genes de resistencia en aislados multirresistentes de animales, medio ambiente y trabajadores de granjas.

Primera. No se consiguió demostrar la hipótesis propuesta de que la combinación dosis-duración del tratamiento con doxiciclina por vía oral influye sobre el desarrollo y/o selección de bacterias resistentes utilizando como modelo animal el conejo y como prototipo de bacteria *E. coli*. Y ello debido, seguramente, al alto porcentaje de aislados de *E. coli* resistentes a este antimicrobiano presentes en la microbiota intestinal antes del tratamiento. En otras palabras, el modelo propuesto no permitió, como inicialmente se pretendía, evaluar el riesgo de desarrollo o selección de *Escherichia coli* resistentes.

Segunda. La microbiota bacteriana habitual de los conejos puede desempeñar un papel importante como reservorio de genes de resistencia a tetraciclinas.

Tercera. Los aislados comensales de *E. coli* de la microbiota intestinal de los conejos son un reservorio de betalactamasas de espectro extendido, cuya transferencia a bacterias patógenas no debería descartarse.

Cuarta. Los genes *qnr* que codifican resistencia a fluoroquinolonas mediada por plásmidos no juegan un papel importante en la selección de aislados resistentes a fluoroquinolonas en conejos.

Quinta. El tratamiento con doxiciclina originó un cambio en las poblaciones de *E. coli* predominantes en la microbiota intestinal de los conejos, favoreciendo en algunos casos el desarrollo de una población homogénea desde el punto de vista genotípico con el fenotipo de resistencia predominante DOX-ERI.

Sexta. Se encontró poca diversidad de genes de resistencia a antimicrobianos en las regiones variables de los integrones caracterizados.

Séptima. Los grupos filogenéticos de *E. coli* detectados con mayor frecuencia entre los aislados de conejos fueron el D y el B2, filogrupos que en otras especies se han asociado con aislados extraintestinales patógenos.

Octava. El hecho de que un mismo fenotipo de resistencia estuviera asociado con diferentes genotipos presentes en los aislados del mismo animal o, a la inversa, que un mismo genotipo se asociara con diferentes fenotipos podría indicar la posible transferencia horizontal entre bacterias de genes de resistencia o a la captación de determinantes genéticos de resistencia.

- Aarestrup, F.M., Bager, F., Jensen, N.E., Madsen, M., Meyling, A., Wegener, H.C., 1998. Resistance to antimicrobial agents used for animal therapy in pathogenic-, zoonotic- and indicator bacteria isolated from different food animals in Denmark: a baseline study for the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Programme (DANMAP). *APMIS* 106, 745-770.
- Aarestrup, F.M., Seyfarth, A.M., Emborg, H.D., Pedersen, K., Hendriksen, R.S., Bager, F., 2001. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2054-2059.
- Aarestrup, F.M., Wegener, H.C., 1999. The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. *Microbes Infect* 1, 639-644.
- Agerso, Y., Sandvang, D., 2005. Class 1 integrons and tetracycline resistance genes in *alcaligenes*, *arthrobacter*, and *Pseudomonas spp.* isolated from pigsties and manured soil. *Appl Environ Microbiol* 71, 7941-7947.
- Alvarez-Fernandez, M., Rodriguez-Sousa, T., Brey-Fernandez, E., Lopez-Melendez, C., Pineiro, L., 2003. [Class 1 integrons in Enterobacteriaceae and its association with multidrug resistance and conjugative plasmids]. *Rev Esp Quimioter* 16, 394-397.
- Alvarez, M., Tran, J.H., Chow, N., Jacoby, G.A., 2004. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 533-537.
- Allmansberger, R., Brau, B., Piepersberg, W., 1985. Genes for gentamicin-(3)-N-acetyl-transferases III and IV. II. Nucleotide sequences of three AAC(3)-III genes and evolutionary aspects. *Mol Gen Genet* 198, 514-520.
- Ambler, J.E., Pinney, R.J., 1995. Positive R plasmid mutator effect on chromosomal mutation to nalidixic acid resistance in nalidixic acid-exposed cultures of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 35, 603-609.
- Ambler, R.P., 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 289, 321-331.
- Ambler, R.P., Coulson, A.F., Frere, J.M., Ghuysen, J.M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R.C., Tiraby, G., Waley, S.G., 1991. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J* 276 (Pt 1), 269-270.
- Antunes, P., Machado, J., Peixe, L., 2006. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *J Antimicrob Chemother* 58, 297-304.
- Antunes, P., Machado, J., Peixe, L., 2007. Dissemination of sul3-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3' conserved sequence region among *Salmonella* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 1545-1548.
- Archambault, M., Petrov, P., Hendriksen, R.S., Asseva, G., Bangtrakulnonth, A., Hasman, H., Aarestrup, F.M., 2006. Molecular characterization and occurrence of extended-spectrum beta-lactamase resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Corvallis from Thailand, Bulgaria, and Denmark. *Microb Drug Resist* 12, 192-198.
- Asai, T., Kojima, A., Harada, K., Ishihara, K., Takahashi, T., Tamura, Y., 2005. Correlation between the usage volume of veterinary therapeutic antimicrobials and resistance in *Escherichia coli* isolated from the feces of food-producing animals in Japan. *Jpn J Infect Dis* 58, 369-372.
- Bagel, S., Hullen, V., Wiedemann, B., Heisig, P., 1999. Impact of gyrA and parC mutations on quinolone resistance, doubling time, and supercoiling degree of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 868-875.
- Baggot, J.D., 2001. Pharmacokinetic terms: symbols and units. *J Vet Pharmacol Ther* 24, 81-82.

- Barlow, R.S., Pemberton, J.M., Desmarchelier, P.M., Gobius, K.S., 2004. Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 838-842.
- Barnes, E.M., 1958. The effect of antibiotic supplements on the faecal streptococci (Lancefield group D) of poultry. *Br Vet J.* 114, 333-344.
- Bartoloni, A., Benedetti, M., Pallecchi, L., Larsson, M., Mantella, A., Strohmeier, M., Bartalesi, F., Fernandez, C., Guzman, E., Vallejos, Y., Villagran, A.L., Guerra, H., Gotuzzo, E., Paradisi, F., Falkenberg, T., Rossolini, G.M., Kronvall, G., 2006. Evaluation of a rapid screening method for detection of antimicrobial resistance in the commensal microbiota of the gut. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100, 119-125.
- Baudry, P.J., Nichol, K., DeCorby, M., Lagace-Wiens, P., Olivier, E., Boyd, D., Mulvey, M.R., Hoban, D.J., Zhanel, G.G., 2009. Mechanisms of resistance and mobility among multidrug-resistant CTX-M-producing *Escherichia coli* from Canadian intensive care units: the 1st report of QepA in North America. *Diagn Microbiol Infect Dis* 63, 319-326.
- Bauernfeind, A., Stemmlinger, I., Jungwirth, R., Ernst, S., Casellas, J.M., 1996. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 509-513.
- Bennett, P.M., 2004. Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement. *Methods Mol Biol* 266, 71-113.
- Berg, D.E., Howe, M.M., 1989. En: *Mobile DNA*. ASM Press, Washington (D.C.), p. 972.
- Bibbal, D., Dupouy, V., Prere, M.F., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2009. Relatedness of *Escherichia coli* strains with different susceptibility phenotypes isolated from swine feces during ampicillin treatment. *Appl Environ Microbiol* 75, 2999-3006.
- Bingen, E., Picard, B., Brahimi, N., Mathy, S., Desjardins, P., Elion, J., Denamur, E., 1998. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J Infect Dis* 177, 642-650.
- Bischoff, K.M., White, D.G., Hume, M.E., Poole, T.L., Nisbet, D.J., 2005. The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 243, 285-291.
- Blake, D.P., Humphry, R.W., Scott, K.P., Hillman, K., Fenlon, D.R., Low, J.C., 2003. Influence of tetracycline exposure on tetracycline resistance and the carriage of tetracycline resistance genes within commensal *Escherichia coli* populations. *J Appl Microbiol* 94, 1087-1097.
- Blanc, V., Mesa, R., Saco, M., Lavilla, S., Prats, G., Miro, E., Navarro, F., Cortes, P., Llagostera, M., 2006. ESBL- and plasmidic class C beta-lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Vet Microbiol* 118, 299-304.
- Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Alonso, M.P., González, E.A., Bernárdez, M.I., *Escherichia coli* patógenos para seres humanos y animales. No publicado. Disponible en: <http://www.usc.es/ecoli/E.coli2.html>. (Fecha de consulta 27/07/2009)
- Boerlin, P., Travis, R., Gyles, C.L., Reid-Smith, R., Janecko, N., Lim, H., Nicholson, V., McEwen, S.A., Friendship, R., Archambault, M., 2005. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *Appl Environ Microbiol* 71, 6753-6761.
- Bonacorsi, S., Bingen, E., 2005. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis. *Int J Med Microbiol* 295, 373-381.
- Bonnet, R., 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1-14.

- Bonnet, R., Dutour, C., Sampaio, J.L., Chanal, C., Sirot, D., Labia, R., De Champs, C., Sirot, J., 2001. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-->Gly. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2269-2275.
- Bonnet, R., Recule, C., Baraduc, R., Chanal, C., Sirot, D., De Champs, C., Sirot, J., 2003. Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. *J Antimicrob Chemother* 52, 29-35.
- Bonnet, R., Sampaio, J.L., Labia, R., De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Sirot, J., 2000. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1936-1942.
- Boucher, Y., Labbate, M., Koenig, J.E., Stokes, H.W., 2007. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol* 15, 301-309.
- Bradford, P.A., 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 14, 933-951, table of contents.
- Bradford, P.A., Yang, Y., Sahm, D., Grope, I., Gardovska, D., Storch, G., 1998. CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 1980-1984.
- Briñas, L., Zarazaga, M., Saenz, Y., Ruiz-Larrea, F., Torres, C., 2002. Beta-lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3156-3163.
- Bryan, A., Shapir, N., Sadowsky, M.J., 2004. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. *Appl Environ Microbiol* 70, 2503-2507.
- Burdett, V., 1991. Purification and characterization of Tet(M), a protein that renders ribosomes resistant to tetracycline. *J Biol Chem* 266, 2872-2877.
- Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B., Guedon, G., 2002. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol Microbiol* 46, 601-610.
- Calvo, J., Martinez-Martinez, L., 2009. [Antimicrobial mechanisms of action]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 27, 44-52.
- Cameron, F.H., Groot Obbink, D.J., Ackerman, V.P., Hall, R.M., 1986. Nucleotide sequence of the AAD(2'') aminoglycoside adenylyltransferase determinant aadB. Evolutionary relationship of this region with those surrounding aadA in R538-1 and dhfrII in R388. *Nucleic Acids Res* 14, 8625-8635.
- Canton, R., Oliver, A., Coque, T.M., Varela Mdel, C., Perez-Diaz, J.C., Baquero, F., 2002. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacter isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol* 40, 1237-1243.
- Canton, R., Valdezate, S., Mir, N., 1999. Resistencia a los antimicrobianos, En: Antimicrobianos en medicina. J. E. García Sanchez, R. LopezyJ. Prieto (Eds.) Sociedad Española de Quimioterapia Prouss Science, Barcelona, pp. 41-67.
- Cao, V., Lambert, T., Courvalin, P., 2002. ColE1-like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-17. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 1212-1217.
- Carattoli, A., 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res* 32, 243-259.
- Carattoli, A., Lovari, S., Franco, A., Cordaro, G., Di Matteo, P., Battisti, A., 2005. Extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 833-835.
- Carlos, C., Pires, M.M., Stoppe, N.C., Hachich, E.M., Sato, M.I., Gomes, T.A., Amaral, L.A., Ottoboni, L.M., 2010. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiol* 10, 161.

- Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P., Phillips, I., 2003. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J Antimicrob Chemother* 52, 159-161.
- Cavaco, L.M., Frimodt-Moller, N., Hasman, H., Guardabassi, L., Nielsen, L., Aarestrup, F.M., 2008. Prevalence of quinolone resistance mechanisms and associations to minimum inhibitory concentrations in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and swine in Denmark. *Microb Drug Resist* 14, 163-169.
- Clark, N.C., Olsvik, O., Swenson, J.M., Spiegel, C.A., Tenover, F.C., 1999. Detection of a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 157-160.
- Cleland, D., Krader, P., Emerson, D., 2008. Use of the DiversiLab repetitive sequence-based PCR system for genotyping and identification of Archaea. *J Microbiol Methods* 73, 172-178.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66, 4555-4558.
- Clewell, D.B., Flannagan, S.E., Jaworski, D.D., 1995. Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends Microbiol* 3, 229-236.
- CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute, 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved Standard M2-A9. Ninth Edition, 26 (1)
- CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute, 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. Third Edition, 28 (8)
- Cocchi, S., Grasselli, E., Gutacker, M., Benagli, C., Convert, M., Piffaretti, J.C., 2007. Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50, 126-132.
- Colom, K., Perez, J., Alonso, R., Fernandez-Aranguiz, A., Larino, E., Cisterna, R., 2003. Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of *bla*TEM, *bla*(SHV) and *bla*OXA-1 genes in Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Lett* 223, 147-151.
- Collis, C.M., Hall, R.M., 1992. Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol Microbiol* 6, 2875-2885.
- Collis, C.M., Kim, M.J., Partridge, S.R., Stokes, H.W., Hall, R.M., 2002. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J Bacteriol* 184, 3017-3026.
- Connell, S.R., Trieber, C.A., Dinos, G.P., Einfeldt, E., Taylor, D.E., Nierhaus, K.H., 2003. Mechanism of Tet(O)-mediated tetracycline resistance. *EMBO J* 22, 945-953.
- Correia, M., Boavida, F., Grosso, F., Salgado, M.J., Lito, L.M., Cristino, J.M., Mendo, S., Duarte, A., 2003. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2838-2843.
- Costa, D., Poeta, P., Saenz, Y., Coelho, A.C., Matos, M., Vinue, L., Rodrigues, J., Torres, C., 2008. Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. *Vet Microbiol* 127, 97-105.
- Cox, A.D., Wilkinson, S.G., 1991. Ionizing groups in lipopolysaccharides of *Pseudomonas cepacia* in relation to antibiotic resistance. *Mol Microbiol* 5, 641-646.
- Crespo, O., Catalano, M., Pineiro, S., Matteo, M., Leanza, A., Centron, D., 2005. Tn7 distribution in *Helicobacter pylori*: a selective paradox. *Int J Antimicrob Agents* 25, 341-344.
- Chanawong, A., M'Zali, F.H., Heritage, J., Xiong, J.H., Hawkey, P.M., 2002. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among Enterobacteriaceae in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 630-637.
- Chang, C.Y., Chang, L.L., Chang, Y.H., Lee, T.M., Chang, S.F., 2000. Characterisation of drug resistance gene cassettes associated with class 1 integrons in clinical isolates of *Escherichia coli* from Taiwan, ROC. *J Med Microbiol* 49, 1097-1102.

- Chaniotaki, S., Giakouppi, P., Tzouvelekis, L.S., Panagiotakos, D., Kozanitou, M., Petrikos, G., Avlami, A., Vatopoulos, A.C., 2004. Quinolone resistance among *Escherichia coli* strains from community-acquired urinary tract infections in Greece. *Clin Microbiol Infect* 10, 75-78.
- Chen, J.Y., Siu, L.K., Chen, Y.H., Lu, P.L., Ho, M., Peng, C.F., 2001. Molecular epidemiology and mutations at *gyrA* and *parC* genes of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolates from a Taiwan medical center. *Microb Drug Resist* 7, 47-53.
- Chen, L., Chen, Z.L., Liu, J.H., Zeng, Z.L., Ma, J.Y., Jiang, H.X., 2007. Emergence of RmtB methylase-producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolates from pigs in China. *J Antimicrob Chemother* 59, 880-885.
- Chopra, I., Roberts, M., 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 232-260 ; second page, table of contents.
- Chung, W.O., Werckenthin, C., Schwarz, S., Roberts, M.C., 1999. Host range of the *ermF* rRNA methylase gene in bacteria of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother* 43, 5-14.
- Danel, F., Hall, L.M., Duke, B., Gur, D., Livermore, D.M., 1999. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1362-1366.
- Davison, J., 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 42, 73-91.
- De Rycke, J., Comtet, E., Chalareng, C., Boury, M., Tasca, C., Milon, A., 1997. Enteropathogenic *Escherichia coli* O103 from rabbit elicits actin stress fibers and focal adhesions in HeLa epithelial cells, cytopathic effects that are linked to an analog of the locus of enterocyte effacement. *Infect Immun* 65, 2555-2563.
- DeFlaun, M.F., Levy, S.B., 1989. Genes and their varied hosts, En: *Gene transfer in the environment*. S. B. Levy, R. V. Miller (Eds.) McGraw Hill, New York, pp. 1-32.
- Di Conza, J.A., Gutkind, G.O., 2010. [Integrins: gene collectors]. *Rev Argent Microbiol* 42, 63-78.
- Diarra, M.S., Silversides, F.G., Diarrassouba, F., Pritchard, J., Masson, L., Brousseau, R., Bonnet, C., Delaquis, P., Bach, S., Skura, B.J., Topp, E., 2007. Impact of feed supplementation with antimicrobial agents on growth performance of broiler chickens, *Clostridium perfringens* and *enterococcus* counts, and antibiotic resistance phenotypes and distribution of antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol* 73, 6566-6576.
- Diarrassouba, F., Diarra, M.S., Bach, S., Delaquis, P., Pritchard, J., Topp, E., Skura, B.J., 2007. Antibiotic resistance and virulence genes in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from commercial broiler chicken farms. *J Food Prot* 70, 1316-1327.
- Dibner, J.J., Richards, J.D., 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult Sci* 84, 634-643.
- Dominguez, E., Zarazaga, M., Saenz, Y., Brinas, L., Torres, C., 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from healthy children in Spain. *Microb Drug Resist* 8, 321-327.
- Doublet, B., Praud, K., Bertrand, S., Collard, J.M., Weill, F.X., Cloeckert, A., 2008. Novel insertion sequence- and transposon-mediated genetic rearrangements in genomic island SGI1 of *Salmonella enterica* serovar Kentucky. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 3745-3754.
- Du, X., Shen, Z., Wu, B., Xia, S., Shen, J., 2005. Characterization of class 1 integrons-mediated antibiotic resistance among calf pathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 245, 295-298.

- Dubois, V., Parizano, M.P., Arpin, C., Coulange, L., Beziau, M.C., Quentin, C., 2007. High genetic stability of integrons in clinical isolates of *Shigella* spp. of worldwide origin. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 1333-1340.
- Durante-Mangoni, E., Grammatikos, A., Utili, R., Falagas, M.E., 2009. Do we still need the aminoglycosides? *Int J Antimicrob Agents* 33, 201-205.
- Eckert, C., Gautier, V., Arlet, G., 2006. DNA sequence analysis of the genetic environment of various blaCTX-M genes. *J Antimicrob Chemother* 57, 14-23.
- Elliott, S.D., Barnes, E.M., 1959. Changes in serological type and antibiotic resistance of Lancefield group D streptococci in chickens receiving dietary chlortetracycline. *J Gen Microbiol* 20, 426-433.
- Enne, V.I., Cassar, C., Sprigings, K., Woodward, M.J., Bennett, P.M., 2008. A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter. *FEMS Microbiol Lett* 278, 193-199.
- Errecalde, J.O., 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública., Roma, Italia, p. 61.
- Escobar-Paramo, P., Le Menac'h, A., Le Gall, T., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., Skurnik, D., Denamur, E., 2006. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environ Microbiol* 8, 1975-1984.
- Escolar Jurado, M., Azanza Perea, J.R., Sadaba Diaz de Rada, B., Honorato, J., 1998. Macrólidos y lincosaminas. *Medicine* 7, 3337-3343.
- Everett, M.J., Jin, Y.F., Ricci, V., Piddock, L.J., 1996. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 2380-2386.
- Fairchild, A.S., Smith, J.L., Idris, U., Lu, J., Sanchez, S., Purvis, L.B., Hofacre, C., Lee, M.D., 2005. Effects of orally administered tetracycline on the intestinal community structure of chickens and on tet determinant carriage by commensal bacteria and *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 71, 5865-5872.
- Falagas, M.E., Bliziotis, I.A., Kasiakou, S.K., Samonis, G., Athanassopoulou, P., Michalopoulos, A., 2005. Outcome of infections due to pandrug-resistant (PDR) Gram-negative bacteria. *BMC Infect Dis* 5, 24.
- FEDESA, 1999. Antibióticos para animales. Una perspectiva sobre antibióticos, salud animal y el debate sobre la resistencia, En: Dossier sobre antibióticos. pp. 1-14.
- Fluit, A.C., Schmitz, F.J., 1999. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18, 761-770.
- Fluit, A.C., Schmitz, F.J., 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect* 10, 272-288.
- Fluit, A.C., Visser, M.R., Schmitz, F.J., 2001. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 14, 836-871, table of contents.
- Fontana, C., Favaro, M., Minelli, S., Bossa, M.C., Testore, G.P., Leonardis, F., Natoli, S., Favalli, C., 2008. *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit: a novel system to study clonal relationship among the isolates. *BMC Infect Dis* 8, 79.
- Ford, P.J., Avison, M.B., 2004. Evolutionary mapping of the SHV beta-lactamase and evidence for two separate IS26-dependent blaSHV mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *J Antimicrob Chemother* 54, 69-75.
- Francia, M.V., Varsaki, A., Garcillan-Barcia, M.P., Latorre, A., Drainas, C., de la Cruz, F., 2004. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev* 28, 79-100.

- French, G.L., Phillips, I., 1997. Resistance, En: Antibiotic and Chemotherapy. Anti-infective agents and their use in therapy. F. W. O'Grady, H.P. Lambert, R.G. FrenchyD. Greenwood (Eds.) Churchill Livigstone, London, U.K.
- Garcia, A., Navarro, F., Miro, E., Mirelis, B., Campoy, S., Coll, P., 2005. Characterization of the highly variable region surrounding the bla(CTX-M-9) gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona. J Antimicrob Chemother 56, 819-826.
- Garcia, J.E., Fresnadillo, M.J., Arce, J.J., García, E., 1999. Antibióticos betalactámicos, En: Antimicrobianos en medicina. J. E. García, R. LopezyJ. Prieto (Eds.) Sociedad Española de Quimioterapia Prouss Science, Barcelona, pp. 213-226.
- Gazouli, M., Tzelepi, E., Markogiannakis, A., Legakis, N.J., Tzouveleakis, L.S., 1998. Two novel plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamases (CTX-M-5 and CTX-M-6) from *Salmonella typhimurium*. FEMS Microbiol Lett 165, 289-293.
- Gellin, G., Langlois, B.E., Dawson, K.A., Aaron, D.K., 1989. Antibiotic resistance of gram-negative enteric bacteria from pigs in three herds with different histories of antibiotic exposure. Appl Environ Microbiol 55, 2287-2292.
- Gérvás, J., 2000. La resistencia a los antibióticos, un problema de salud pública. Atención Primaria 25, 589-596.
- Gniadkowski, M., Schneider, I., Palucha, A., Jungwirth, R., Mikiewicz, B., Bauernfeind, A., 1998. Cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. Antimicrob Agents Chemother 42, 827-832.
- Gobernado, M., Salavert, M., Santos, M., Canton, E., Pastor, A., Romá, E., 1999. Quinolonas, En: Antimicrobianos en Medicina. J.E. Garcia Sanchez, R. LopezyJ. Prieto (Eds.) Prouss Science, Sociedad Española de Quimioterapia y SmithKline Beecham., Barcelona, pp. 383-416.
- Goldman, R.A., Hasan, T., Hall, C.C., Strycharz, W.A., Cooperman, B.S., 1983. Photoincorporation of tetracycline into *Escherichia coli* ribosomes. Identification of the major proteins photolabeled by native tetracycline and tetracycline photoproducts and implications for the inhibitory action of tetracycline on protein synthesis. Biochemistry 22, 359-368.
- Goldstein, C., Lee, M.D., Sanchez, S., Hudson, C., Phillips, B., Register, B., Grady, M., Liebert, C., Summers, A.O., White, D.G., Maurer, J.J., 2001. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. Antimicrob Agents Chemother 45, 723-726.
- Gonzalez, G., Mella, S., Zemelman, R., Bello, H., Dominguez, M., 2004. [Integrins and resistance gene cassettes: structure and role against antimicrobials]. Rev Med Chil 132, 619-626.
- Gordon, D.M., Cowling, A., 2003. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. Microbiology 149, 3575-3586.
- Gow, S.P., Waldner, C.L., Harel, J., Boerlin, P., 2008. Associations between antimicrobial resistance genes in fecal generic *Escherichia coli* isolates from cow-calf herds in western Canada. Appl Environ Microbiol 74, 3658-3666.
- Grindley, N.D.F., Craig, N., Craigie, R., Gellert, M., Lambowitz, A.M., 2001. The movement of Tn3-like elements: Transposition and cointegrate resolution, En: Mobile DNA II. ASM Press, Washington D.C.
- Guardabassi, L., Dijkshoorn, L., Collard, J.M., Olsen, J.E., Dalsgaard, A., 2000. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic Acinetobacter strains. J Med Microbiol 49, 929-936.
- Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Helmuth, R., Guth, B.E., Beutin, L., 2006. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* O111 isolates. J Antimicrob Chemother 57, 1210-1214.

- Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Malorny, B., Lehmann, S., Helmuth, R., 2003. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *J Antimicrob Chemother* 52, 489-492.
- Hall, L.M., Livermore, D.M., Gur, D., Akova, M., Akalin, H.E., 1993. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 1637-1644.
- Hall, R.M., 1997. Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria, En: *Ciba Foundation Symposium 2007- Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread*. D. Chadwick, J. Goode (Eds.) John Wiley and Sons Limited, Chichester, U.K., pp. 192-202.
- Hall, R.M., Collis, C.M., 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* 15, 593-600.
- Hanau-Bercot, B., Podglajen, I., Casin, I., Collatz, E., 2002. An intrinsic control element for translational initiation in class 1 integrons. *Mol Microbiol* 44, 119-130.
- Hansson, K., Sundstrom, L., Pelletier, A., Roy, P.H., 2002. IntI2 integron integrase in Tn7. *J Bacteriol* 184, 1712-1721.
- Heisig, P., 1996. Genetic evidence for a role of parC mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 879-885.
- Heritage, J., M'Zali, F.H., Gascoyne-Binzi, D., Hawkey, P.M., 1999. Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 44, 309-318.
- Hernandez, J.R., Martinez-Martinez, L., Canton, R., Coque, T.M., Pascual, A., 2005. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 2122-2125.
- Herzer, P.J., Inouye, S., Inouye, M., Whittam, T.S., 1990. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172, 6175-6181.
- Hollingshead, S., Vapnek, D., 1985. Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase. *Plasmid* 13, 17-30.
- Hopkins, K.L., Davies, R.H., Threlfall, E.J., 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents* 25, 358-373.
- Hopkins, K.L., Liebana, E., Villa, L., Batchelor, M., Threlfall, E.J., Carattoli, A., 2006. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3203-3206.
- Ishii, Y., Ohno, A., Taguchi, H., Imajo, S., Ishiguro, M., Matsuzawa, H., 1995. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 2269-2275.
- Jacoby, G.A., 1994. Extrachromosomal resistance in gram-negative organisms: the evolution of beta-lactamase. *Trends Microbiol* 2, 357-360.
- Jacoby, G.A., Chow, N., Waites, K.B., 2003. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 559-562.
- Jacoby, G.A., Walsh, K.E., Mills, D.M., Walker, V.J., Oh, H., Robicsek, A., Hooper, D.C., 2006. qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 1178-1182.
- Jain, R., Rivera, M.C., Moore, J.E., Lake, J.A., 2003. Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. *Mol Biol Evol* 20, 1598-1602.
- Jara, M.A., 2007. Tetraciclinas: un modelo de resistencia antimicrobiana. *Avances en Ciencias Veterinarias* 22, 49-55.

- Jeong, S.H., Bae, I.K., Lee, J.H., Sohn, S.G., Kang, G.H., Jeon, G.J., Kim, Y.H., Jeong, B.C., Lee, S.H., 2004. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean nationwide survey. *J Clin Microbiol* 42, 2902-2906.
- Johnson, J.R., Owens, K.L., Clabots, C.R., Weissman, S.J., Cannon, S.B., 2006. Phylogenetic relationships among clonal groups of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as assessed by multi-locus sequence analysis. *Microbes Infect* 8, 1702-1713.
- Johnson, J.R., Stell, A.L., 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 181, 261-272.
- Jones, C.S., Osborne, D.J., Stanley, J., 1992. Enterobacterial tetracycline resistance in relation to plasmid incompatibility. *Mol Cell Probes* 6, 313-317.
- Jones, M.E., Peters, E., Weersink, A.M., Fluit, A., Verhoef, J., 1997. Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. *Lancet* 349, 1742-1743.
- Jurado, S., Orden, J.A., Horcajo, P., De La Fuente, R., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Martinez-Pulgarin, S., Dominguez-Bernal, G., 2008. Characterization of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* strains from ruminants. *J Vet Diagn Invest* 20, 342-345.
- Kadlec, K., Schwarz, S., 2008. Analysis and distribution of class 1 and class 2 integrons and associated gene cassettes among *Escherichia coli* isolates from swine, horses, cats and dogs collected in the BfT-GermVet monitoring study. *J Antimicrob Chemother* 62, 469-473.
- Kang, H.Y., Jeong, Y.S., Oh, J.Y., Tae, S.H., Choi, C.H., Moon, D.C., Lee, W.K., Lee, Y.C., Seol, S.Y., Cho, D.T., Lee, J.C., 2005a. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. *J Antimicrob Chemother* 55, 639-644.
- Kang, S.G., Lee, D.Y., Shin, S.J., Ahn, J.M., Yoo, H.S., 2005b. Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and class 1 integron carriage among *Escherichia coli* isolates. *J Vet Sci* 6, 201-205.
- Karim, A., Poirel, L., Nagarajan, S., Nordmann, P., 2001. Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. *FEMS Microbiol Lett* 201, 237-241.
- Kariuki, S., Corkill, J.E., Revathi, G., Musoke, R., Hart, C.A., 2001. Molecular characterization of a novel plasmid-encoded cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2141-2143.
- Kim, E.S., Jeong, J.Y., Choi, S.H., Lee, S.O., Kim, S.H., Kim, M.N., Woo, J.H., Kim, Y.S., 2009a. Plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump gene, *qepA*, in *Escherichia coli* clinical isolates in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 65, 335-338.
- Kim, H.B., Park, C.H., Kim, C.J., Kim, E.C., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., 2009b. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 639-645.
- Komp Lindgren, P., Karlsson, A., Hughes, D., 2003. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 3222-3232.
- Kwa, A.L., Tam, V.H., Falagas, M.E., 2008. Polymyxins: a review of the current status including recent developments. *Ann Acad Med Singapore* 37, 870-883.
- Labbate, M., Case, R.J., Stokes, H.W., 2009. The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. *Methods Mol Biol* 532, 103-125.
- Labia, R., 1999. Analysis of the *bla*(toho) gene coding for Toho-2-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 2576-2577.
- Landman, D., Georgescu, C., Martin, D.A., Quale, J., 2008. Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev* 21, 449-465.

- Lanz, R., Kuhnert, P., Boerlin, P., 2003. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet Microbiol* 91, 73-84.
- Lartigue, M.F., Poirel, L., Nordmann, P., 2004. Diversity of genetic environment of bla(CTX-M) genes. *FEMS Microbiol Lett* 234, 201-207.
- Leclercq, R., Courvalin, P., 1993. Mechanisms of resistance to macrolides and functionally related antibiotics, En: *Macrolides-chemistry, pharmacology and clinical uses*. A. Bryskier, J. P. Butzler, H. C. Neuyp. M. Tulkens (Eds.) Arnette, Blackwell, Paris, pp. 125-141.
- Lee, Y.J., Cho, J.K., Kim, K.S., Tak, R.B., Kim, A.R., Kim, J.W., Im, S.K., Kim, B.H., 2005. Fluoroquinolone resistance and gyrA and parC mutations of *Escherichia coli* isolated from chicken. *J Microbiol* 43, 391-397.
- Lees, P., Shojaee Aliabadi, F., 2003. Antimicrobianos que inhiben la función de los ácidos nucleicos, En: *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. L. M. Botana, F. LandomiyT. Martin-Jiménez (Eds.) McGraw Hill-Interamericana, España, pp. 484-492.
- Lehn, N., Stower-Hoffmann, J., Kott, T., Strassner, C., Wagner, H., Kronke, M., Schneider-Brachert, W., 1996. Characterization of clinical isolates of *Escherichia coli* showing high levels of fluoroquinolone resistance. *J Clin Microbiol* 34, 597-602.
- Lemos, L.M., 2003. Antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas, En: *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. L. M. Botana, F. LandomiyT. Martin-Jiménez (Eds.) McGraw-Hill Interamericana, España, pp. 468-472.
- Leverstein-van Hall, M.A., HE, M.B., AR, T.D., Paauw, A., Fluit, A.C., Verhoef, J., 2003. Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *J Infect Dis* 187, 251-259.
- Leverstein-Van Hall, M.A., Paauw, A., Box, A.T., Blok, H.E., Verhoef, J., Fluit, A.C., 2002. Presence of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital. *J Clin Microbiol* 40, 3038-3040.
- Lévesque, C., Piche, L., Larose, C., Roy, P.H., 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 185-191.
- Lévesque, C., Roy, P.H., 1993. PCR analysis of integrons, En: *Molecular Diagnostic Microbiology: principles and applications*. D. Persing, Smith, T.F., Tenover, F.C. y White, T.J. (Ed.) ASM Press, Portland, p. 664.
- Levy, S.B., 1998. La resistencia contra los antibióticos. *Investigación y Ciencia*. Prensa Científica S.A. 260, 14-22.
- Levy, S.B., McMurry, L.M., Barbosa, T.M., Burdett, V., Courvalin, P., Hillen, W., Roberts, M.C., Rood, J.I., Taylor, D.E., 1999. Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1523-1524.
- Li, J., Nation, R.L., Milne, R.W., Turnidge, J.D., Coulthard, K., 2005. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 25, 11-25.
- Li, X.Z., Mehrotra, M., Ghimire, S., Adewoye, L., 2007. beta-Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol* 121, 197-214.
- Liao, W., Jiang, J., Xu, Y., Yi, J., Chen, T., Su, X., Pan, S., Wei, X., Li, Y., 2010. Survey for beta-lactamase among bacterial isolates from Guangzhou, China hospitals between 2005-2006. *J Antibiot (Tokyo)* 63, 225-229.
- Liebert, C.A., Hall, R.M., Summers, A.O., 1999. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 507-522.
- Lim, S.K., Lee, H.S., Nam, H.M., Cho, Y.S., Kim, J.M., Song, S.W., Park, Y.H., Jung, S.C., 2007. Antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* strains isolated from fecal samples of cattle and pigs in Korea during 2003-2004. *Int J Food Microbiol* 116, 283-286.

- Livermore, D.M., 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis* 36, S11-23.
- Lu, L., Dai, L., Wang, Y., Wu, C., Chen, X., Li, L., Qi, Y., Xia, L., Shen, J., 2010. Characterization of antimicrobial resistance and integrons among *Escherichia coli* isolated from animal farms in Eastern China. *Acta Trop* 113, 20-25.
- Ma, J., Zeng, Z., Chen, Z., Xu, X., Wang, X., Deng, Y., Lu, D., Huang, L., Zhang, Y., Liu, J., Wang, M., 2009. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')*-Ib-cr, and *qepA* among ceftiofur-resistant Enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 519-524.
- Mabilat, C., Courvalin, P., 1990. Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 34, 2210-2216.
- Machado, E., Canton, R., Baquero, F., Galan, J.C., Rollan, A., Peixe, L., Coque, T.M., 2005. Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 1823-1829.
- Mahillon, J., Leonard, C., Chandler, M., 1999. IS elements as constituents of bacterial genomes. *Res Microbiol* 150, 675-687.
- Marin, M., Gudiol, F., 2003. [beta-Lactam antibiotics]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 21, 42-55.
- Marti, S., Fernandez-Cuenca, F., Pascual, A., Ribera, A., Rodriguez-Bano, J., Bou, G., Miguel Cisneros, J., Pachon, J., Martinez-Martinez, L., Vila, J., 2006. [Prevalence of the *tetA* and *tetB* genes as mechanisms of resistance to tetracycline and minocycline in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24, 77-80.
- Martín-Jimenez, T., 2002. Sulfamidas y diaminopirimidinas, En: *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. L. M. Botana, F. LandomiyT. Martín-Jiménez (Eds.) McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España, pp. 447-454.
- Martinez-Freijo, P., Fluit, A.C., Schmitz, F.J., Grek, V.S., Verhoef, J., Jones, M.E., 1998. Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J Antimicrob Chemother* 42, 689-696.
- Martinez-Freijo, P., Fluit, A.C., Schmitz, F.J., Verhoef, J., Jones, M.E., 1999. Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of Enterobacteriaceae isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 686-689.
- Martinez-Martinez, L., Eliecer Cano, M., Manuel Rodriguez-Martinez, J., Calvo, J., Pascual, A., 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther* 6, 685-711.
- Martinez-Martinez, L., Pascual, A., Jacoby, G.A., 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 351, 797-799.
- Mascaretti, O., 2003. Inhibitor of the 30's ribosomal subunit aminoglycosides and tetracyclines. ASM Press, Washington D.C., 229-246 pp.
- Maynard, C., Bekal, S., Sanschagrín, F., Levesque, R.C., Brousseau, R., Masson, L., Larivière, S., Harel, J., 2004. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. *J Clin Microbiol* 42, 5444-5452.
- Maynard, C., Fairbrother, J.M., Bekal, S., Sanschagrín, F., Levesque, R.C., Brousseau, R., Masson, L., Larivière, S., Harel, J., 2003. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 3214-3221.
- Mazel, D., 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* 4, 608-620.

- Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V.A., Davies, J., 2000. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel aad gene. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1568-1574.
- McBride, S.M., Fischetti, V.A., Leblanc, D.J., Moellering, R.C., Jr., Gilmore, M.S., 2007. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS One* 2, e582.
- McDermott, P.F., Walker, R.D., White, D.G., 2003. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *Int J Toxicol* 22, 135-143.
- McLellan, S.L., Daniels, A.D., Salmore, A.K., 2003. Genetic characterization of *Escherichia coli* populations from host sources of fecal pollution by using DNA fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* 69, 2587-2594.
- Medina, A., Horcajo, P., Jurado, S., De la Fuente, R., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Dominguez-Bernal, G., Orden, J.A., 2011. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli* strains from ruminants. *J Vet Diagn Invest* 23, 91-95.
- Mellon, M., Benbrook, C., Beenbrook, K.L., 2001. Hogging it: Estimates of Antimicrobial Abuse in Livestock. Union of Concerned Scientist, Cambridge, M.A.
- Mendez, B., Tachibana, C., Levy, S.B., 1980. Heterogeneity of tetracycline resistance determinants. *Plasmid* 3, 99-108.
- Mesa, R.J., Blanc, V., Blanch, A.R., Cortes, P., Gonzalez, J.J., Lavilla, S., Miro, E., Muniesa, M., Saco, M., Tortola, M.T., Mirelis, B., Coll, P., Llagostera, M., Prats, G., Navarro, F., 2006. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother* 58, 211-215.
- Mingeot-Leclercq, M.P., Glupczynski, Y., Tulkens, P.M., 1999. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 727-737.
- Molina, J., Cordero, E., Palomino, J., Pachon, J., 2009. [Aminoglycosides and polymyxins]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 27, 178-188.
- Monstein, H.J., Ostholm-Balkhed, A., Nilsson, M.V., Nilsson, M., Dornbusch, K., Nilsson, L.E., 2007. Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. *APMIS* 115, 1400-1408.
- Moreno, M.A., Dominguez, L., Teshager, T., Herrero, I.A., Porrero, M.C., 2000. Antibiotic resistance monitoring: the Spanish programme. The VAV Network. Red de Vigilancia de Resistencias Antibioticas en Bacterias de Origen Veterinario. *Int J Antimicrob Agents* 14, 285-290.
- Moulin-Schouleir, M., Reperant, M., Laurent, S., Bree, A., Mignon-Grasteau, S., Germon, P., Rasschaert, D., Schouler, C., 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J Clin Microbiol* 45, 3366-3376.
- Mugnaioli, C., Luzzaro, F., De Luca, F., Brigante, G., Perilli, M., Amicosante, G., Stefani, S., Toniolo, A., Rossolini, G.M., 2006. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 2700-2706.
- Mullany, P., Roberts, A.P., Wang, H., 2002. Mechanism of integration and excision in conjugative transposons. *Cell Mol Life Sci* 59, 2017-2022.
- Naas, T., Mikami, Y., Imai, T., Poirel, L., Nordmann, P., 2001. Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J Bacteriol* 183, 235-249.
- Navarro, F., Mesa, R.J., Miro, E., Gomez, L., Mirelis, B., Coll, P., 2007. Evidence for convergent evolution of CTX-M-14 ESBL in *Escherichia coli* and its prevalence. *FEMS Microbiol Lett* 273, 120-123.
- Neu, H.C., 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257, 1064-1073.

- Ng, L.K., Martin, I., Alfa, M., Mulvey, M., 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol Cell Probes* 15, 209-215.
- Nicholls, T., Acar, J., Anthony, F., Franklin, A., Gupta, R., Tamura, Y., Thompson, S., Threlfall, E.J., Vose, D., van Vuuren, M., White, D.G., Wegener, H.C., Costarrica, M.L., 2001. Antimicrobial resistance: monitoring the quantities of antimicrobials used in animal husbandry. *Rev Sci Tech* 20, 841-847.
- Nijsten, R., London, N., van den Bogaard, A., Stobberingh, E., 1994. Resistance in faecal *Escherichia coli* isolated from pigfarmers and abattoir workers. *Epidemiol Infect* 113, 45-52.
- Nogrady, N., Paszti, J., Piko, H., Nagy, B., 2006. Class 1 integrons and their conjugal transfer with and without virulence-associated genes in extra-intestinal and intestinal *Escherichia coli* of poultry. *Avian Pathol* 35, 349-356.
- Nordmann, P., Poirel, L., 2005. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 56, 463-469.
- Normand, E.H., Gibson, N.R., Reid, S.W., Carmichael, S., Taylor, D.J., 2000. Antimicrobial-resistance trends in bacterial isolates from companion-animal community practice in the UK. *Prev Vet Med* 46, 267-278.
- Novais, A., 2010. Unidad de captura y dispersión génica en la evolución de las betalactamasas de espectro extendido. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Nowrouzian, F.L., Ostblom, A.E., Wold, A.E., Adlerberth, I., 2009. Phylogenetic group B2 *Escherichia coli* strains from the bowel microbiota of Pakistani infants carry few virulence genes and lack the capacity for long-term persistence. *Clin Microbiol Infect* 15, 466-472.
- Oliver, A., Coque, T.M., Alonso, D., Valverde, A., Baquero, F., Canton, R., 2005. CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among Enterobacteriaceae in a Spanish hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 1567-1571.
- Oliver, A., Perez-Diaz, J.C., Coque, T.M., Baquero, F., Canton, R., 2001. Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 616-620.
- Orman, B., 2006. La resistencia bacteriana y sus mecanismos de dispersión. *Revista de la Facultad de Odontología (UBA)* 21, 13-19.
- Osborn, A.M., Boltner, D., 2002. When phage, plasmids, and transposons collide: genomic islands, and conjugative- and mobilizable-transposons as a mosaic continuum. *Plasmid* 48, 202-212.
- Osborn, M., Bron, S., Firth, N., GHolsappel, A., Huddleston, R., Kiewiet, W., Meijer, J., Segers, R., Skurray, P., Terpstra, C.M., Thomas, P., Thorsted, E., Turner, S.L., 2000. The evolution of bacterial plasmids, En: *The Horizontal Gene Pool: Bacterial plasmids and gene spread*. C.M. Thomas (Ed.) Hardwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 301-361.
- Ozeki, S., Deguchi, T., Yasuda, M., Nakano, M., Kawamura, T., Nishino, Y., Kawada, Y., 1997. Development of a rapid assay for detecting *gyrA* mutations in *Escherichia coli* and determination of incidence of *gyrA* mutations in clinical strains isolated from patients with complicated urinary tract infections. *J Clin Microbiol* 35, 2315-2319.
- Padilha, M.T.S., Licois, D., Coudert, P., 1996. Frequency of the carriage and enumeration of *Escherichia coli* in caecal content of 15 to 49 day old rabbits. *World Rabbit Congress*, Toulouse, Francia, 09-12/07/1996, pp. 99-102.
- Pai, H., Choi, E.H., Lee, H.J., Hong, J.Y., Jacoby, G.A., 2001. Identification of CTX-M-14 extended-spectrum beta-lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *J Clin Microbiol* 39, 3747-3749.

- Park, C.H., Robicsek, A., Jacoby, G.A., Sahm, D., Hooper, D.C., 2006. Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3953-3955.
- Partridge, S.R., Hall, R.M., 2003. The IS1111 family members IS4321 and IS5075 have subterminal inverted repeats and target the terminal inverted repeats of Tn21 family transposons. *J Bacteriol* 185, 6371-6384.
- Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E., Iredell, J.R., 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* 33, 757-784.
- Pérez de Rozas, A., Roca, M., Carabaño, R., De Blas, C., Francesch, M., Brufau, J., Martín-Orúe, S., Gasa, J., Campoy, S., Barbé, J., Badiola, I., 2003. El estudio de la diversidad intestinal por RFLP. XIX Curso de Especialización FEDNA, Madrid, España, pp. 31-45.
- Perichon, B., Courvalin, P., Galimand, M., 2007. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 2464-2469.
- Perreten, V., Boerlin, P., 2003. A new sulfonamide resistance gene (sul3) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 1169-1172.
- Peters, E.D., Leverstein-van Hall, M.A., Box, A.T., Verhoef, J., Fluit, A.C., 2001. Novel gene cassettes and integrons. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2961-2964.
- Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G.A., 2002. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 1-11.
- Philippon, L.N., Naas, T., Bouthors, A.T., Barakett, V., Nordmann, P., 1997. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 2188-2195.
- Picard, B., Garcia, J.S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J., Denamur, E., 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun* 67, 546-553.
- Picard, B., Sevali Garcia, J., CGouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Denamur, E., 1998. The link between Phylogeny and Virulence in *Escherichia coli* Extraintestinal Infection. *Infect Immun* 67.
- Piddock, L.J., 1995. Mechanisms of resistance to fluoroquinolones: state-of-the-art 1992-1994. *Drugs* 49 Suppl 2, 29-35.
- Piddock, L.J.V., 1996. Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? *J Antimicrob Chemother* 38, 1-3.
- Poeta, P., Radhouani, H., Goncalves, A., Figueiredo, N., Carvalho, C., Rodrigues, J., Igrejas, G., 2009. Genetic Characterization of Antibiotic Resistance in Enteropathogenic *Escherichia coli* Carrying Extended-Spectrum beta-Lactamases Recovered from Diarrhoeic Rabbits. *Zoonoses Public Health*.
- Poirel, L., Naas, T., Le Thomas, I., Karim, A., Bingen, E., Nordmann, P., 2001. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 3355-3361.
- Politi, L., Tassios, P.T., Lambiri, M., Kansouzidou, A., Pasiotou, M., Vatopoulos, A.C., Mellou, K., Legakis, N.J., Tzouveleakis, L.S., 2005. Repeated occurrence of diverse extended-spectrum beta-lactamases in minor serotypes of food-borne *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *J Clin Microbiol* 43, 3453-3456.
- Poole, K., 1994. Bacterial multidrug resistance--emphasis on efflux mechanisms and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 34, 453-456.

- Poyart, C., Celli, J., Trieu-Cuot, P., 1995. Conjugative transposition of Tn916-related elements from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 500-506.
- Radstrom, P., Skold, O., Swedberg, G., Flensburg, J., Roy, P.H., Sundstrom, L., 1994. Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. *J Bacteriol* 176, 3257-3268.
- Radstrom, P., Swedberg, G., Skold, O., 1991. Genetic analyses of sulfonamide resistance and its dissemination in gram-negative bacteria illustrate new aspects of R plasmid evolution. *Antimicrob Agents Chemother* 35, 1840-1848.
- Recchia, G.D., Hall, R.M., 1995a. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* 141 (Pt 12), 3015-3027.
- Recchia, G.D., Hall, R.M., 1995b. Plasmid evolution by acquisition of mobile gene cassettes: plasmid pIE723 contains the aadB gene cassette precisely inserted at a secondary site in the incQ plasmid RSF1010. *Mol Microbiol* 15, 179-187.
- Rice, L.B., 1998. Tn916 family conjugative transposons and dissemination of antimicrobial resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 1871-1877.
- Roberts, M.C., 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev* 19, 1-24.
- Roberts, M.C., 1997. Genetic mobility and distribution of tetracycline resistance determinants. *Ciba Found Symp* 207, 206-218; discussion 219-222.
- Roberts, M.C., 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 245, 195-203.
- Roberts, M.C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L.B., Rood, J., Seppala, H., 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 2823-2830.
- Robinson, D.A., Kearns, A.M., Holmes, A., Morrison, D., Grundmann, H., Edwards, G., O'Brien, F.G., Tenover, F.C., McDougal, L.K., Monk, A.B., Enright, M.C., 2005. Re-emergence of early pandemic *Staphylococcus aureus* as a community-acquired methicillin-resistant clone. *Lancet* 365, 1256-1258.
- Rocha-Gracia, R., Ruiz, E., Romero-Romero, S., Lozano-Zarain, P., Somalo, S., Palacios-Hernandez, J.M., Caballero-Torres, P., Torres, C., 2010. Detection of the plasmid-borne quinolone resistance determinant qepA1 in a CTX-M-15-producing *Escherichia coli* strain from Mexico. *J Antimicrob Chemother* 65, 169-171.
- Rodriguez-Baño, J., Navarro, M.D., Romero, L., Muniain, M.A., Perea, E.J., Perez-Cano, R., Hernandez, J.R., Pascual, A., 2006. Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infection or colonization: implications for control. *Clin Infect Dis* 42, 37-45.
- Rodriguez-Martinez, J.M., Pascual, A., Garcia, I., Martinez-Martinez, L., 2003. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnr among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 52, 703-706.
- Romero, L., Lopez, L., Rodriguez-Bano, J., Ramon Hernandez, J., Martinez-Martinez, L., Pascual, A., 2005. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 11, 625-631.
- ROSCO-DIAGNÓSTICA. 2005/2006. Guía del Usuario - Neo-Sensitabs™.
- Rowe-Magnus, D.A., Mazel, D., 2001. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Curr Opin Microbiol* 4, 565-569.
- Rowe-Magnus, D.A., Mazel, D., 2002. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol* 292, 115-125.

- Ruiz, J., 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 51, 1109-1117.
- Sabate, M., Prats, G., 2002. [Structure and function of integrons]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 20, 341-345.
- Sabate, M., Tarrago, R., Navarro, F., Miro, E., Verges, C., Barbe, J., Prats, G., 2000. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1970-1973.
- Sabath, L.D., Lorian, V., Gerstein, D., Loder, P.B., Finland, M., 1968. Enhancing effect on alkalization of the medium on the activity of erythromycin against gram-negative bacteria. *Appl Microbiol* 16, 1288-1292.
- Saenz, Y., Brinas, L., Dominguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., Torres, C., 2004. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 3996-4001.
- Saenz, Y., Zarazaga, M., Brinas, L., Lantero, M., Ruiz-Larrea, F., Torres, C., 2001. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 18, 353-358.
- Saenz, Y., Zarazaga, M., Brinas, L., Ruiz-Larrea, F., Torres, C., 2003. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *J Antimicrob Chemother* 51, 1001-1005.
- Saladin, M., Cao, V.T., Lambert, T., Donay, J.L., Herrmann, J.L., Ould-Hocine, Z., Verdet, C., Delisle, F., Philippon, A., Arlet, G., 2002. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett* 209, 161-168.
- Salysers, A.A., 2002. An overview of the genetic basis of antibiotic resistance in bacteria and its implications for agriculture. *Anim Biotechnol* 13, 1-5.
- Salysers, A.A., Shoemaker, N.B., Stevens, A.M., Li, L.Y., 1995. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol Rev* 59, 579-590.
- Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S., Mabilat, C., 1995. Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of enterobacteriaceae. *Microb Drug Resist* 1, 195-202.
- Sandvang, D., Aarestrup, F.M., 2000. Characterization of aminoglycoside resistance genes and class 1 integrons in porcine and bovine gentamicin-resistant *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist* 6, 19-27.
- Sawant, A.A., Hegde, N.V., Straley, B.A., Donaldson, S.C., Love, B.C., Knabel, S.J., Jayarao, B.M., 2007. Antimicrobial-resistant enteric bacteria from dairy cattle. *Appl Environ Microbiol* 73, 156-163.
- Scott, K.P., 2002. The role of conjugative transposons in spreading antibiotic resistance between bacteria that inhabit the gastrointestinal tract. *Cell Mol Life Sci* 59, 2071-2082.
- Schwarz, S., Roberts, M.C., Werckenthin, C., Pang, Y., Lange, C., 1998. Tetracycline resistance in *Staphylococcus spp.* from domestic animals. *Vet Microbiol* 63, 217-227.
- Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N., Whittam, T.S., 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* 51, 873-884.
- Sengelov, G., Halling-Sorensen, B., Aarestrup, F.M., 2003. Susceptibility of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* isolated from pigs and broiler chickens to tetracycline degradation products and distribution of tetracycline resistance determinants in *E. coli* from food animals. *Vet Microbiol* 95, 91-101.

- Shaheen, B.W., Oyarzabal, O.A., Boothe, D.M., 2010. The role of class 1 and 2 integrons in mediating antimicrobial resistance among canine and feline clinical *E. coli* isolates from the US. *Vet Microbiol* 144, 363-370.
- Shakil, S., Khan, R., Zarrilli, R., Khan, A.U., 2008. Aminoglycosides versus bacteria--a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *J Biomed Sci* 15, 5-14.
- Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S., Miller, G.H., 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 57, 138-163.
- Sherburne, C.K., Lawley, T.D., Gilmour, M.W., Blattner, F.R., Burland, V., Grotbeck, E., Rose, D.J., Taylor, D.E., 2000. The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer. *Nucleic Acids Res* 28, 2177-2186.
- Shimizu, K., Kumada, T., Hsieh, W.C., Chung, H.Y., Chong, Y., Hare, R.S., Miller, G.H., Sabatelli, F.J., Howard, J., 1985. Comparison of aminoglycoside resistance patterns in Japan, Formosa, and Korea, Chile, and the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 28, 282-288.
- Sidorchuk, Z., Zahring, U., Rietschel, E.T., 1983. Chemical structure of the lipid A component of the lipopolysaccharide from a *Proteus mirabilis* Re-mutant. *Eur J Biochem* 137, 15-22.
- Skurnik, D., Le Menac'h, A., Zurakowski, D., Mazel, D., Courvalin, P., Denamur, E., Andremont, A., Ruimy, R., 2005. Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 3062-3065.
- Skurnik, D., Ruimy, R., Andremont, A., Amorin, C., Rouquet, P., Picard, B., Denamur, E., 2006. Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 57, 1215-1219.
- Smith, C.A., Baker, E.N., 2002. Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2, 143-160.
- Smith, J.L., Drum, D.J., Dai, Y., Kim, J.M., Sanchez, S., Maurer, J.J., Hofacre, C.L., Lee, M.D., 2007. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 73, 1404-1414.
- Sorum, H., Sunde, M., 2001. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Vet Res* 32, 227-241.
- Soto, S., 2006. Expresión de factores de virulencia en cepas extraintestinales de *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24, 479-480.
- Soulsby, L., 2007. Antimicrobials and animal health: a fascinating nexus. *J Antimicrob Chemother* 60 Suppl 1, i77-78.
- Stine, O.C., Johnson, J.A., Keefer-Norris, A., Perry, K.L., Tigno, J., Qiayumi, S., Stine, M.S., Morris, J.G., Jr., 2007. Widespread distribution of tetracycline resistance genes in a confined animal feeding facility. *Int J Antimicrob Agents* 29, 348-352.
- Su, J., Shi, L., Yang, L., Xiao, Z., Li, X., Yamasaki, S., 2006. Analysis of integrons in clinical isolates of *Escherichia coli* in China during the last six years. *FEMS Microbiol Lett* 254, 75-80.
- Sunde, M., 2005. Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products of Norwegian origin. *J Antimicrob Chemother* 56, 1019-1024.
- Sunde, M., Fossum, K., Solberg, A., Sorum, H., 1998. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine. *Microb Drug Resist* 4, 289-299.
- Sunde, M., Sorum, H., 1999. Characterization of integrons in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine. *Microb Drug Resist* 5, 279-287.

- Sunde, M., Sorum, H., 2001. Self-transmissible multidrug resistance plasmids in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of healthy swine. *Microb Drug Resist* 7, 191-196.
- Sundstrom, L., Roy, P.H., Skold, O., 1991. Site-specific insertion of three structural gene cassettes in transposon Tn7. *J Bacteriol* 173, 3025-3028.
- Sussmann, A., Mattos, L., Restrepo, A., 2002. Resistencia bacteriana. *Revista Universitas Médica* 43 (1).
- Swann, M.M., Baxter, K.L., Field, H.I. 1969. Report of the Joint Committee on the Use of Antibiotic in Animal Husbandry and Veterinary Medicine. HMSO.
- Swedberg, G., Skold, O., 1983. Plasmid-borne sulfonamide resistance determinants studied by restriction enzyme analysis. *J Bacteriol* 153, 1228-1237.
- Tassios, P.T., Gazouli, M., Tzelepi, E., Milch, H., Kozlova, N., Sidorenko, S., Legakis, N.J., Tzouveleakis, L.S., 1999. Spread of a *Salmonella typhimurium* clone resistant to expanded-spectrum cephalosporins in three European countries. *J Clin Microbiol* 37, 3774-3777.
- Taylor, D.E., Chau, A., 1996. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 1-5.
- Taylor, D.E., Gribeel, A., Lawley, T.D., Tracz, D.M., 2004. Antibiotic resistance plasmids, En: *Plasmid Biology*. B.E. FunnelyG.J. Phillips (Eds.) American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E., 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 8, 207-217.
- Tenover, F.C., 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control* 34, S3-10; discussion S64-73.
- Thomson, K.S., Smith Moland, E., 2000. Version 2000: the new beta-lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes Infect* 2, 1225-1235.
- Toussaint, A., Merlin, C., 2002. Mobile elements as a combination of functional modules. *Plasmid* 47, 26-35.
- Tran, J.H., Jacoby, G.A., 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5638-5642.
- Turner, S.M., Chaudhuri, R.R., Jiang, Z.D., DuPont, H., Gyles, C., Penn, C.W., Pallen, M.J., Henderson, I.R., 2006. Phylogenetic comparisons reveal multiple acquisitions of the toxin genes by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of different evolutionary lineages. *J Clin Microbiol* 44, 4528-4536.
- Urumova, V., Petrov, V., 2008. Analysis of antimicrobial drug resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in rabbits with diarrhoeic syndrome. *Trakia Journal of Sciences* 6 (1), 36-40.
- van Belkum, A., Struelens, M., de Visser, A., Verbrugh, H., Tibayrenc, M., 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 14, 547-560.
- van den Bogaard, A.E., London, N., Driessen, C., Stobberingh, E.E., 2001. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J Antimicrob Chemother* 47, 763-771.
- van den Bogaard, A.E., Stobberingh, E.E., 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents* 14, 327-335.
- van Treeck, U., Schmidt, F., Wiedemann, B., 1981. Molecular nature of a streptomycin and sulfonamide resistance plasmid (pBP1) prevalent in clinical *Escherichia coli* strains and integration of an ampicillin resistance transposon (TnA). *Antimicrob Agents Chemother* 19, 371-380.
- Vanhoof, R., Content, J., Van Bossuyt, E., Dewit, L., Hannecart-Pokorni, E., 1992. Identification of the aadB gene coding for the aminoglycoside-2"-O-nucleotidyltransferase, ANT(2"), by means of the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother* 29, 365-374.

- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 19, 6823-6831.
- Vigil, K.J., Adachi, J.A., Aboufaycal, H., Hachem, R.Y., Reitzel, R.A., Jiang, Y., Tarrand, J.J., Chemaly, R.F., Bodey, G.P., Rolston, K.V., Raad, I., 2009. Multidrug-resistant *Escherichia coli* bacteremia in cancer patients. *Am J Infect Control*.
- Vila, J., Marcos, M.A., Jimenez de Anta, M.T., 1996. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. *J Med Microbiol* 44, 482-489.
- Vila, J., Ruiz, J., Marco, F., Barcelo, A., Goni, P., Giralt, E., Jimenez de Anta, T., 1994. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob Agents Chemother* 38, 2477-2479.
- Vila, J., Vargas, M., Ruiz, J., Espasa, M., Pujol, M., Corachan, M., Jimenez de Anta, M.T., Gascon, J., 2001. Susceptibility patterns of enteroaggregative *Escherichia coli* associated with traveller's diarrhoea: emergence of quinolone resistance. *J Med Microbiol* 50, 996-1000.
- Viñué, L., 2010. Prevalencia y diversidad de integrones en cepas clínicas y comensales de *Escherichia coli*. Universidad de la Rioja, Logroño.
- Walk, S.T., Alm, E.W., Calhoun, L.M., Mladonicky, J.M., Whittam, T.S., 2007. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Environ Microbiol* 9, 2274-2288.
- Walsh, C., 2003. Antibiotics that block DNA replication and repair: the qinolones, En: *Antibiotics. Actions, origins, resistance*. C. Walsh (Ed.) ASM, Washington, D.C.
- Wang, M., Sahm, D.F., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., 2004. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1295-1299.
- Waturangi, D.E., Suwanto, A., Schwarz, S., Erdelen, W., 2003. Identification of class 1 integrons-associated gene cassettes in *Escherichia coli* isolated from Varanus spp. in Indonesia. *J Antimicrob Chemother* 51, 175-177.
- Webber, M., Piddock, L.J., 2001. Quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Vet Res* 32, 275-284.
- Wegrzyn, G., 2005. What does "plasmid biology" currently mean?. *Summary of the Plasmid Biology 2004. Meeting*. *Plasmid* 53, 14-22.
- Weigel, L.M., Steward, C.D., Tenover, F.C., 1998. *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 2661-2667.
- Weill, F.X., Lailier, R., Praud, K., Kerouanton, A., Fabre, L., Brisabois, A., Grimont, P.A., Cloeckaert, A., 2004. Emergence of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. *J Clin Microbiol* 42, 5767-5773.
- Weisblum, B., 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 577-585.
- White, P.A., McIver, C.J., Rawlinson, W.D., 2001. Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2658-2661.
- World Health Organisation. 1997. The medical impact of the use of antimicrobials in food animals. Report of a WHO Meeting, Berlin, Germany, 13-17 October 1997. The medical impact of the use of antimicrobials in food animals. Report of a WHO Meeting, Berlin, Germany, 13-17 October 1997. Geneva, Switzerland.
- World Health Organisation. 2000. WHO global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food. Report of a WHO consultation. Geneva, Switzerland. 23 pp.

- World Health Organisation. 2002. Monitoring antimicrobial usage in food animals for the protection of human health. Report of a WHO consultation in Oslo, Norway, 10-13 September 2001. Monitoring antimicrobial usage in food animals for the protection of human health. Report of a WHO consultation in Oslo, Norway, 10-13 September 2001. Geneva Switzerland.
- World Health Organisation. 2003. Joint FAO/OIE/WHO expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: scientific assessment, Geneva, Switzerland, 1-5 December 2003. Joint FAO/OIE/WHO expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: scientific assessment, Geneva, Switzerland, 1-5 December 2003. Geneva, Switzerland.
- Willmott, C.J., Maxwell, A., 1993. A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 126-127.
- Witte, W., 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* 279, 996-997.
- Witte, W., 2000. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *Int J Antimicrob Agents* 14, 321-325.
- Wright, G.D., 1999. Aminoglycoside-modifying enzymes. *Curr Opin Microbiol* 2, 499-503.
- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Arakawa, Y., 2008. Plasmid-mediated qepA gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 1564-1566.
- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Konda, T., Arakawa, Y., 2007. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 3354-3360.
- Yang, C.M., Lin, M.F., Lin, C.H., Huang, Y.T., Hsu, C.T., Liou, M.L., 2009. Characterization of antimicrobial resistance patterns and integrons in human fecal *Escherichia coli* in Taiwan. *Jpn J Infect Dis* 62, 177-181.
- Yang, H., Chen, S., White, D.G., Zhao, S., McDermott, P., Walker, R., Meng, J., 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *J Clin Microbiol* 42, 3483-3489.
- Zhang, X.Y., Ding, L.J., Yue, J., 2009. Occurrence and characteristics of class 1 and class 2 integrons in resistant *Escherichia coli* isolates from animals and farm workers in northeastern China. *Microb Drug Resist* 15, 323-328.